

Reaktionsfähige Aminosäureester
als Modellsubstanzen
für die Aminoacyl-ribonucleinsäure

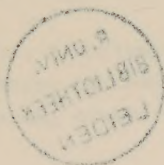
von

WOLFGANG KARAU

1961

Reaktionsfähige Aminosäureester als Modellsubstanzen

für die Aminoacyl-ribonucleinsäure



Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Hohen Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt

von

Wolfgang Karau

aus

Schneidemühl

Oktober 1961



1. Berichterstatter: Professor Dr. A. Butenandt

2. Berichterstatter: Professor Dr. F. Lynen

Tag der mündlichen Prüfung: 13.12.1961

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Januar 1959 bis Juni 1961 unter der Leitung von Herrn Professor Dr. A. Butenandt im Max-Planck-Institut für Biochemie in München ausgeführt.

Herrn Professor Dr. A. Butenandt und Herrn Dr. H.G. Zachau danke ich herzlich für die vielseitige Förderung dieser Arbeit.

Herrn Dozent Dr. E. Biekert und Fräulein I. Köhler danke ich für die Aufnahme und Diskussion der IR-Spektren, Fräulein G. Schild für UV-spektroskopische Messungen.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

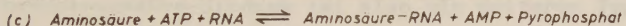
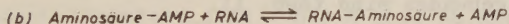
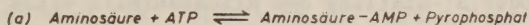
Inhaltsverzeichnis

	Seite
Einleitung und Problemstellung	1
Teil I	
Auswahl der Modellsubstanzen	5
Darstellung der Alkohole	5
Herstellung der Aminosäureester	6
1. Carbobenzoxyminosäureester	7
2. Hydrierung der Carbobenzoxy- aminosäureester	11
Herstellung der Essigsäureester	13
Die sterische Einheitlichkeit der cis-trans- Isomeren	14
Kinetische Messungen	15
Berechnung der k- und $t_{1/2}$ -Werte	18
Versuchsergebnisse und ihre Deutung	23
Der Einfluß des Fünfringes	24
Der Einfluß der nachbarständigen Hydroxylgruppe	24
Der Einfluß des Ringsauerstoffs	30
Der Einfluß der Säurekomponente	31
Teil II	
Nucleosid-Aminosäureester	35
Herstellung von 5'-Aminoacyladenosen	35
Herstellung von 2'- (bzw. 3'-) Valyladenosen	36
Experimenteller Teil	40
Zusammenfassung der Ergebnisse	66
Literaturverzeichnis	68

Einleitung und Problemstellung

Nach den heutigen Vorstellungen verläuft die Biosynthese der Proteine aus Aminosäuren über mehrere Stufen (1):

In einem ersten Schritt werden die Aminosäuren mit Hilfe eines für jede Aminosäure spezifischen Enzyms aktiviert. Dabei wird Adenosintriphosphorsäure (ATP) verbraucht, und es entsteht das Aminosäure-Adenosinmonophosphorsäure-Anhydrid, das fest am Enzym haftet. Das Enzym überträgt in der zweiten Stufe die Aminosäure auf die sog. "Transfer-Ribonucleinsäure" (RNA, Molekulargewicht etwa 20 000 bis 40 000), und Adenosinmonophosphorsäure (AMP) wird frei. Diese beiden Schritte werden durch die Gleichungen (a) bis (c) wiedergegeben:



Mit Hilfe der Transfer-Ribonucleinsäure des Cytoplasmas werden die Aminosäuren den Ribosomen zugeführt (2), an denen sich die weitere Synthese der Proteine strukturgebunden vollzieht. Genaues über den letzten Schritt ist nicht bekannt. Vermutlich werden die Aminosäuren auf eine hochmolekulare Ribonucleinsäure übertragen, die als Matrizie für die Verknüpfung der einzelnen Aminosäuren dient. In diesem Zusammenhang wird eine "messenger"-Ribonucleinsäure diskutiert (3). Möglicherweise sind die Transfer-Ribonucleinsäuren oder Teile davon als sog. "Adaptoren" an der Wirkung der hochmolekularen Ribonucleinsäure beteiligt (4).

Die Ausdrücke "lösliche Ribonucleinsäure" und "Transfer-Ribonucleinsäure" werden häufig nebeneinander gebraucht. Dabei kennzeichnet der erste Ausdruck das Verhalten bei der Isolierung, der zweite die Funktion im biologischen Geschehen. Von "Aminoacyl-ribonucleinsäure" wird gesprochen, wenn die Transfer-Ribonucleinsäure mit Aminosäuren beladen ist.

Die lösliche Ribonucleinsäure ist in den letzten Jahren eingehend untersucht worden. Sie kann aus tierischem und pflanzlichem Material gewonnen werden (1). Wird z.B. Rattenleber homogenisiert und bei etwa 100 000 g eine Stunde zentrifugiert, so bleibt die lösliche Ribonucleinsäure im Überstand und kann aus ihm nach Entfernung des Eiweißes mit Säure gefällt werden. Die lösliche Ribonucleinsäure besitzt, wie Canellakis gezeigt hat (5), als Endgruppen zwei Cytidinreste und einen Adenosinrest. Nach Hecht, Stephenson und Zamecnik (6) ist diese Gruppierung für den Einbau von Aminosäuren in die Ribonucleinsäure unentbehrlich. Zachau, Acs und Lipmann haben diese Befunde bestätigt und ergänzt (7): Sie haben lösliche Ribonucleinsäure mit ^{14}C -Leucin bzw. ^{14}C -Valin beladen und mit Ribonuclease gespalten. Aus dem Reaktionsgemisch isolierten sie 2'-(oder 3')-Aminoacyladenosen, welches praktisch die gesamte eingesetzte Radioaktivität enthielt. Damit war gezeigt, daß die Aminosäuren esterartig in 2'- oder 3'-Stellung des Riboseanteils eines endständigen Adenosins gebunden sind (Abb. 1).

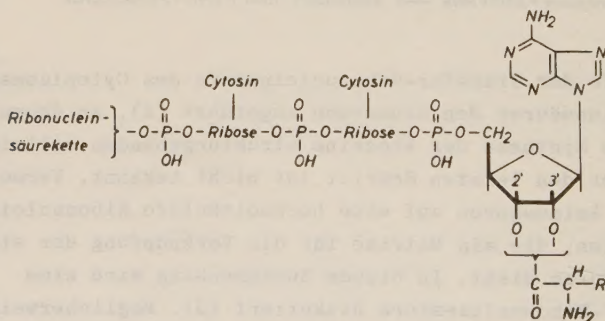


Abb. 1: Aminoacyl-ribonucleinsäure

In mehreren Arbeitskreisen ist es auf verschiedenen Wegen gelungen, die lösliche Ribonucleinsäure in Fraktionen zu zerlegen, die eine erhöhte Aufnahmefähigkeit für bestimmte Aminosäuren besitzen (2). Daraus scheint hervorzugehen, daß jede Aminosäure von einer für sie spezifischen löslichen Ribonucleinsäure übertragen wird, d.h. die lösliche Ribonucleinsäure

besteht aus mehreren Aminosäure-spezifischen Transfer-Ribonucleinsäuren.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit zwei Problemen, die mit der Aminoacyl-ribonucleinsäure zusammenhängen:

1. mit der Frage nach den Strukturelementen, die die Reaktionsfähigkeit der Esterbindung bedingen, und
2. mit der Frage nach der Verknüpfungsstelle von Aminosäure und Ribose.

Die besonderen Eigenschaften der Aminosäure-Ribonucleinsäure-Esterbindung sind durch einige thermodynamische und kinetische Untersuchungen charakterisiert worden. Es wurde u.a. gezeigt, daß die Reaktion (c) (S. 1) reversibel ist (8,9) und daß das Gleichgewicht dieser Reaktion ungefähr in der Mitte liegt (10 - 13). Da bei der Spaltung einer Pyrophosphatbindung in der Adenosintriphosphorsäure eine Energie von $\Delta F = - 7$ bis $- 8$ kcal frei wird (14), sind auch zur Verknüpfung von Aminosäure und Ribonucleinsäure etwa 7 bis 8 kcal aufzuwenden. Die Aminosäure-Ribonucleinsäure-Bindung ist also ein weiterer Typ einer sog. "energiereichen Bindung".

Der überraschend hohe Energieinhalt der Aminoacyl-ribonucleinsäure ist von einer großen Reaktionsfähigkeit begleitet, die ihre Funktion als Aminosäureüberträger in der Zelle verstehen läßt und die u.a. durch eine große Instabilität gegenüber Hydroxylamin zum Ausdruck kommt. Z.B. beträgt die Halbwertszeit für die Reaktion mit 0,8 m Hydroxylamin bei pH 7,0 und 30° ungefähr 3 Minuten (15).

Wie kürzlich gezeigt worden ist (16), entspricht die Verseifungsgeschwindigkeit der Valyl-ribonucleinsäure ungefähr der des Valyladenosinmonophosphates. Weiterhin sind die Halbwertszeiten der Verseifung bei Valyl-adenosin, -inosin, -cytidin und -uridin ungefähr gleich. Valyladenosinmonophosphat reagiert dagegen langsamer als Valyladenosin; die Phosphorsäure am C-5-Atom der Ribose führt also zu einer Herabsetzung der Reaktionsfähigkeit.

Diese Ergebnisse legen den Schluß nahe, daß die Reaktionsfähigkeit der Aminoacyl-ribonucleinsäure nicht auf ihrer hochmolekularen Struktur oder auf Strukturmerkmalen der Base beruht, sondern wahrscheinlich auf Strukturelemente der Ribose zurückgeht. Es werden im folgenden (Teil I) kinetische Versuche mit Modellsubstanzen beschrieben werden, die zur Ermittlung dieser Strukturelemente dienen sollen (17).

Bei der Strukturaufklärung des Aminoacyladenosins aus Aminoacyl-ribonucleinsäure (vgl. Abb. 1) war offen geblieben, ob die Aminosäure mit der 2'- oder 3'-Hydroxylgruppe der Ribose verestert ist. Diese Frage läßt sich entscheiden, indem man reines 2'- und 3'-Aminoacyladenosin synthetisiert und die beiden Substanzen mit dem aus Aminoacyl-ribonucleinsäure isolierten Produkt vergleicht. Im zweiten Teil der Arbeit wurde deshalb versucht, die bei der Synthese der Modellsubstanzen gewonnenen Erfahrungen zur Herstellung definierter Aminosäureester des Adenosins auszunutzen.

Teil I

Auswahl der Modellsubstanzen

Der Einfluß von Strukturelementen der Ribose auf die Reaktionsfähigkeit der Aminoacyl-ribonucleinsäure wird an Modellsubstanzen untersucht. Dazu eignen sich Ester von Aminosäuren mit Alkoholen, die die Grundstruktur der Ribose besitzen, sich aber von ihr durch bestimmte Merkmale unterscheiden. Durch Vergleich der Eigenschaften dieser Substanzen untereinander und mit denen der Aminoacyl-ribonucleinsäure kann man zu Aussagen über den Einfluß einzelner Strukturelemente auf die Reaktionsfähigkeit kommen.

Die Ribose liegt in der Aminoacyl-ribonucleinsäure als Fünfring vor. Eine der beiden cis-ständigen Hydroxylgruppen an C-2 und C-3 ist mit einer Aminosäure verestert (vgl. Abb. 1, S.2). Um den Einfluß des Fünfringes, des Ringsauerstoffs und der zur Estergruppe nachbarständigen Hydroxylgruppe auf die Reaktionsfähigkeit zu untersuchen, bieten sich die Aminosäureester folgender Alkohole an: 1. Cyclopentanol, 2. cis- und trans-Cyclopentandiol(1,2), 3. 3-Hydroxy-tetrahydrofuran, 4. cis- und trans-3,4-Dihydroxy-tetrahydrofuran. Um einen Überblick über die Reaktionsfähigkeit der Modellsubstanzen zu erhalten, wird als Bezugspunkt für die Vergleiche eine bekannte Verbindung, der Glycinäthylester, gewählt.

Die Frage nach einer Beeinflussung der Reaktionsfähigkeit durch die Substituenten an C-1 und C-4 der Ribose bleibt offen. - Durch Vergleich der Ester verschiedener Säuren wird geprüft, in welchem Ausmaß die Säurekomponente die Reaktionsfähigkeit beeinflusst.

Darstellung der Alkohole

Für Vorversuche zur Veresterung wurden die nach bekannten Vorschriften (18,19) besonders leicht zugänglichen Cyclohexandiole(1,2) verwendet.

Zur Herstellung des cis-Cyclopentandiols(1,2) geht man vom Cyclopenten aus. Zur Überführung eines Alkens in ein cis-1,2-

Diol eignet sich die Oxydation mit Jod in Gegenwart von Silberacetat nach Woodward (20), mit Wasserstoffperoxid und Osmiumtetroxid als Katalysator, mit Osmiumtetroxid und schließlich mit Kaliumpermanganat. Vorversuche, den Alkohol auf den ersten beiden Wegen herzustellen, verliefen nicht erfolgreich. Die Darstellung von cis-Cyclopentandiol mittels Permanganatoxydation ist bereits von van Loon beschrieben worden (21), doch liefert sie nur Ausbeuten von etwa 15%. Durch Arbeiten bei tieferer Temperatur konnten Owen und Smith die Ausbeute auf 34% steigern (22). Diese beiden Wege wurden zur Darstellung benutzt. - Die Darstellung des trans-Cyclopentandiols(1,2) ist von Verkade et al. beschrieben worden (23). Das Alken wird mit Perbenzoesäure oxydiert und das Epoxid hydrolytisch gespalten.

Cis-3,4-Dihydroxy-tetrahydrofuran ist leicht aus Mesoerythrit zugänglich nach einer von Reppe und Mitarbeitern für die Synthese des trans-Isomeren aus D,L-Erythrit gegebenen Vorschrift (24). Durch Erhitzen mit Schwefelsäure wird aus dem Polyalkohol unter Ringschluß ein Mol Wasser abgespalten. - Das trans-3,4-Dihydroxy-tetrahydrofuran kann analog dem cis-Isomeren hergestellt werden (24,25). Nach Reppe und Mitarbeitern erhält man es auch aus 2,5-Dihydrofuran durch Anlagerung von hypochloriger Säure an die Doppelbindung, Überführung des Chlorhydrins in das Epoxid und hydrolytische Spaltung des letzteren zum Diol (24). Mit besseren Ausbeuten als die letzte Methode verläuft die in dieser Arbeit angewandte direkte Epoxydation von 2,5-Dihydrofuran mit Perameisensäure und die anschließende Verseifung des entstandenen Ameisensäureesters (s. Experimentellen Teil).

Die dargestellten Cyclopentan- und Tetrahydrofurandiole sind sehr hygroskopisch. Die kristallisierenden trans-Diole zerfließen bereits nach kurzem Stehen an der Luft.

Herstellung der Aminosäureester

Aminosäuren lassen sich im allgemeinen nach den gleichen Methoden verestern wie Carbonsäuren, vorausgesetzt, daß die

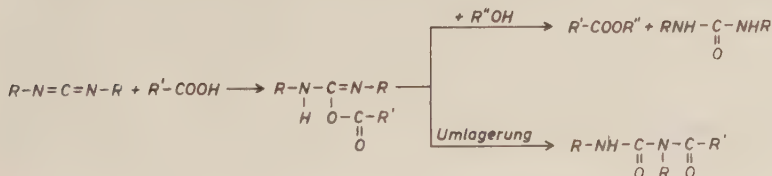
Aminogruppe geschützt ist. Die Aminogruppe der Säure ist stärker nucleophil als die Hydroxylgruppe des Alkohols, so daß ohne Schutz der Aminogruppe Selbstkondensation der Aminosäure eintreten würde.

Es sollen Aminosäureester empfindlicher Alkohole hergestellt werden. Es kommen deshalb nur solche Methoden zu ihrer Synthese in Betracht, die unter schonenden Bedingungen verlaufen. Weiter sollen die Methoden später auch nach Möglichkeit zur Veresterung von Ribosederivaten herangezogen werden können. Diese Bedingungen scheint die Kondensation von Aminosäure und Alkohol mit Hilfe von N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid bzw. N,N'-Carbonyl-di-imidazol zu erfüllen. Die Aminogruppe der Säure kann mit dem Carbobenzoxyrest geschützt werden, der sich leicht, z.B. durch katalytische Hydrierung, wieder entfernen läßt.

1. Carbobenzoxyaminosäureester

a. Kondensationen mit N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid.

Das N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid ist 1950 von Schmidt und Schnegg zur Darstellung von Estern benutzt worden (26). Khorana und Todd haben es in die Chemie der Nucleinsäuren zur Synthese von Phosphorsäureestern (27) und Sheehan und Hess in die Peptidchemie zur Verknüpfung von Aminosäuren eingeführt (28). Das N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid wirkt auf folgende Weise:



Zuerst bildet sich aus der Säure und N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid ein O-Acylderivat, das mit dem Alkohol unter Esterbildung reagieren kann. Daneben entsteht N,N'-Dicyclohexylharnstoff. Das O-Acylderivat kann sich aber auch - namentlich bei

höherer Temperatur - in einer unerwünschten Nebenreaktion in das entsprechende N-Acylderivat umlagern. Die Bindung des Säurerestes an den Stickstoff ist viel fester als die an den Sauerstoff; das N-Acylderivat bewirkt daher keine Veresterung mehr. Es sind Fälle bekannt, bei denen die Esterbildung durch die Entstehung von N-Acylharnstoff vollständig unterdrückt wird (29). Bei Kondensationen von Säuren und Diolen mit N,N'-Dicyclohexyl-carbodiimid entstehen neben dem gesuchten Monoester stets der entsprechende Diester, N-Acylharnstoff und Dicyclohexylharnstoff.

Die ersten Kondensationsversuche mit N,N'-Dicyclohexyl-carbodiimid wurden mit trans-Cyclohexandiol(1,2) und Carbobenzyglycin durchgeführt. Als Lösungsmittel kann man Methylenchlorid verwenden, doch steigt die Ausbeute beträchtlich an, wenn man die Reaktion in trockenem Pyridin durchführt. Aus dem entstehenden Reaktionsgemisch kann überschüssiges N,N'-Dicyclohexyl-carbodiimid leicht herausgewaschen werden und der N,N'-Dicyclohexyl-harnstoff auf Grund seiner Unlöslichkeit in vielen Lösungsmitteln abgeschieden werden. Die Isolierung des Monoesters gelingt durch Chromatographie an saurem Aluminiumoxid. Die Chromatographie an neutralem oder alkalischem Aluminiumoxid führt zur Zersetzung des Esters. - Der Ester des cis-Cyclohexandiols(1,2) läßt sich in der entsprechenden Weise herstellen.

Die Kondensation von trans-3,4-Dihydroxy-tetrahydrofuran mit Carbobenzyglycin mittels N,N'-Dicyclohexyl-carbodiimid geht auf dem oben erwähnten Weg glatt. Zur Abtrennung des Monoesters ist die Chromatographie an Aluminiumoxid jedoch nicht geeignet. Die Isolierung des Monoesters gelingt durch Chromatographie an teilweise inaktiviertem Kieselgel (vgl. unten). Der Diester kann allerdings auf diesem Wege nicht frei von N-Acylharnstoff erhalten werden.

b. Kondensationen mit N,N'-Carbonyl-di-imidazol.

1928 fanden Bergmann und Zervas, daß man in 3-Stellung acylierte Histidinderivate zur Übertragung von Säureestern benutzen kann. Wie 1953 T. Wieland und Schneider zeigten, besitzt N-acyliertes Imidazol die gleiche Eigenschaft (30):



Präparative Bedeutung erhielten die N-Acyl-imidazole mit der Einführung des N,N'-Carbonyl-di-imidazols durch Staab (31). 1958 benutzten Anderson und Paul das Reagenz zur Herstellung von Peptiden (32) und 1959 wendete es Staab erstmalig zur Herstellung von Carbonsäureestern an (33).

Die Herstellung des Reagenzes auf dem von Staab beschriebenen Weg - Imidazol wird mit Phosgen in Tetrahydrofuranlösung umgesetzt - bereitet Schwierigkeiten, da sich das Reagenz schon bei der Herstellung teilweise zersetzt. Anderson und Paul haben auftretende Schwierigkeiten dadurch beseitigen können, daß sie bei der Darstellung statt Tetrahydrofuran als Lösungsmittel Benzol verwendeten (32). Imidazol löst sich aber nur schwer in Benzol, so daß man mit großen Lösungsmittelmengen arbeiten muß. Die Schwierigkeiten lassen sich einfacher umgehen, indem man das Reagenz in Tetrahydrofuranlösung herstellt, wie ursprünglich angegeben, aber in einer gut ausgeheizten Apparatur unter trockenem Stickstoff arbeitet.

Die Kondensation von Alkoholen und Säuren mit N,N'-Carbonyl-di-imidazol führt über folgende Stufen:



Ein Nachteil des N,N'-Carbonyl-di-imidazols gegenüber dem N,N'-Dicyclohexyl-carbodiimid ist die wegen der großen Feuchtigkeitsempfindlichkeit etwas unbequeme Handhabung; mit N,N'-Dicyclohexyl-carbodiimid dagegen kann man teilweise sogar in wäßriger Lösung arbeiten. Das N,N'-Carbonyl-di-imidazol hat aber den großen Vorteil, daß bei der Reaktion neben den im allgemeinen wenig wasserlöslichen Estern nur Kohlendioxid und das leicht wasserlösliche Imidazol entsteht, so daß man die Ester auf sehr einfache Weise aus dem Reaktionsgemisch isolieren kann. Bei der Kondensation der Cyclopentan- und Tetrahydrofurandiole mit Carbobenzoxyaminosäuren mittels N,N'-Carbonyl-di-imidazol entstehen - wie auch mit N,N'-Dicyclohexyl-carbodiimid - stets Gemische von Mono- und Diestern in Form zäher Öle, die nur in wenigen Fällen zum Kristallisieren gebracht werden können.

Als analytisches Hilfsmittel bei der Isolierung der Monoester aus den Estergemischen hat sich die Dünnschichtchromatographie sehr gut bewährt (34). Die Diester besitzen im Lösungsmittelsystem Chloroform-Aceton (85/15) höhere R_f-Werte als die Monoester. Die Substanzen können auf der Platte sichtbar gemacht werden in Anlehnung an ein Verfahren, das Rydon und Smith zum Nachweis primärer und sekundärer Amine und Amide in der Papierchromatographie verwendet haben (35): Durch Behandeln mit Chlor entsteht aus dem Amin bzw. Amid die N-Chloroverbindung, die aus Kaliumjodid Jod in Freiheit setzt, das mit Stärke die bekannte Blaufärbung gibt. Die Dünnschichtchromatographie ist der Papierchromatographie im Fall der Carbobenzoxyaminosäureester durch ihre größere Schnelligkeit und Einfachheit überlegen. Ihre Empfindlichkeit ist höher als die der Elementaranalyse: Bei dem Carbobenzoxyglycinmono- und -diester des trans-3,4-Dihydroxytetrahydrofurans, die beide durch Kristallisation in analysenreiner Form erhalten worden waren, konnte noch deutlich eine gegenseitige Verunreinigung festgestellt werden.

Die präparative Trennung der bei der Kondensation mit N,N'-Carbonyl-di-imidazol erhaltenen Gemische aus Mono- und

Diestern durch Kristallisation ist nur in einem Einzelfall gelungen. Es wurden deshalb säulenchromatographische Methoden herangezogen. Nachdem die Chromatographie an Aluminiumoxid unter verschiedenen Bedingungen keinen Erfolg gezeigt hatte, wurde das Adsorbens der Dünnschichtchromatographie untersucht; es handelt sich dabei um ein Kieselgel mit Zusatz von Bindemitteln, das etwa 13% Wasser enthält. Es zeigte sich, daß die Estergemische an Kieselgel "für Verteilungschromatographie" (ohne Zusatz von Bindemitteln), welches mit der entsprechenden Menge Wasser inaktiviert war, gut getrennt werden können. Auch das bei den Dünnschichtplatten benutzte Lösungsmittelsystem ließ sich bei der Säulenchromatographie verwenden. - Die Carbobenzoxyaminosäureester des Cyclopentanol und des 3-Hydroxy-tetrahydrofurans wurden ebenfalls zur Entfernung geringer Verunreinigungen an Kieselgel chromatographiert.

2. Hydrierung der Carbobenzoxyaminosäureester

Carbobenzoxyaminosäureester können auf verschiedene Weise in die Aminosäureester übergeführt werden: durch Reduktion mit Natrium in flüssigem Ammoniak, durch Behandeln mit Bromwasserstoffsäure in Eisessig und durch katalytische Hydrierung. Die alkalische Abspaltung des Carbobenzoxyrestes dürfte zu einer Verseifung des Esters führen, während bei der sauren Spaltung mit einer Umesterung zu rechnen ist. Die Gefahr einer Umesterung ist bei der katalytischen Hydrierung geringer.

Vorversuche zur Hydrierung wurden zunächst mit den Carbobenzoxyglycinestern der Cyclohexandiole durchgeführt. In Diisopropyläther, Methanol und Methanol mit einem geringen Zusatz an Eisessig gelang die Hydrierung nur mit schlechten Ausbeuten, in Eisessig verläuft sie ohne Schwierigkeiten. Der Hydrierrückstand war wasserlöslich und zeigte eine positive Hydroxylaminreaktion, er reagierte auch mit Ninhydrin, wie es für freie Aminosäureester zu erwarten ist. - Alle in Tab. 9 (S. 45) erwähnten Carbobenzoxyaminosäureester wurden in Eisessig hydriert.

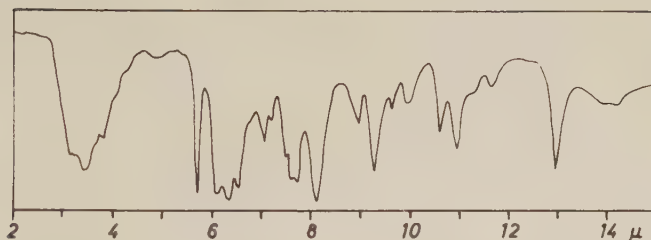
Hydrierungsprodukte sind die Aminosäureester in Form ihrer Acetate. Nur in einzelnen Fällen, wie bei dem Glycinester des trans-3,4-Dihydroxy-tetrahydrofurans, konnte das Acetat kristallin erhalten werden. Die Ester lassen sich aber in die gut kristallisierenden Oxalate überführen, die leicht durch Umlösen gereinigt werden können.

Die Oxalsäure kann als zweibasige Säure saure und neutrale Salze bilden. Diese lassen sich durch Bestimmung des Oxalsäuregehaltes mittels Permanganattitration und auf Grund ihres IR-Spektrums voneinander unterscheiden. Saure Oxalate haben bei 1750 cm^{-1} ($5,72\text{ }\mu$) eine scharfe Bande, die bei den neutralen Oxalaten stark verbreitert ist (Abb. 2, S. 13).

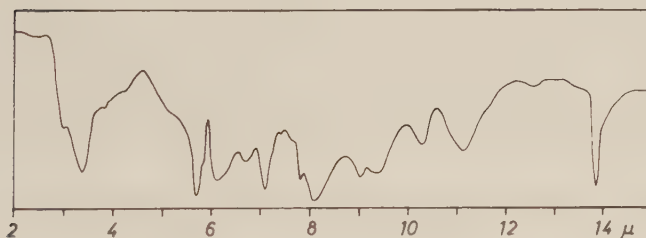
Bei den dargestellten Verbindungen herrschen die sauren Salze vor, nur die Glycinester des cis-Cyclopentandiols(1,2) und des cis-3,4-Dihydroxy-tetrahydrofurans bilden neutrale Oxalate. Diese lassen sich durch Umkristallisieren mit einem Überschuß an Oxalsäure nicht in die sauren Salze überführen. Das steht in Übereinstimmung mit einem Befund, den Stoll bei Versuchen mit dem Oxalat des N-[β -(5-Hydroxy-indolyl)-(3))-äthyl]-piperidins erhalten hat (36). - Es ist bemerkenswert, daß alle Aminosäureester der einwertigen Alkohole und der trans-Diole als saure Salze vorliegen, die Glycinester des cis-Cyclopentandiols und des cis-3,4-Dihydroxy-tetrahydrofurans aber als neutrale. Ersetzt man im Falle des cis-3,4-Dihydroxy-tetrahydrofurans das Glycin durch das räumlich größere Valin, entsteht bereits wieder das saure Salz. Welche Faktoren für die Ausbildung von neutralen oder sauren Oxalaten ausschlaggebend sind, kann man auf Grund der vorliegenden Verbindungen nicht entscheiden. Es ist jedoch eine Beteiligung sterischer Faktoren zu vermuten.

Von einer anderen Arbeitsgruppe sind ebenfalls zwei Aminosäureester hergestellt worden, die den hier beschriebenen Modellsubstanzen sehr ähnlich sind. Wieland, Merz und Pfeleiderer (45) erhielten den Leucinester des trans-Cyclopentandiols(1,2) aus dem Säurechlorid und dem Alkohol. Bei dem Versuch, auch den Leucinester des cis-Cyclopentandiols(1,2) darzustellen, erhielten sie ein Produkt mit einem Reinheitsgrad von 71%.

Abb. 2: IR-Spektren von Oxalaten der Aminosäureester.



Glycinester des trans-3,4-Dihydroxy-tetrahydrofurans,
saures Oxalat (in KBr gepreßt).



Glycinester des cis-3,4-Dihydroxy-tetrahydrofurans,
neutrales Oxalat (in KBr gepreßt)

Herstellung der Essigsäureester

Die Essigsäureester der ein- und zweiwertigen Alkohole lassen sich in einfacher Weise aus den entsprechenden Alkoholen und Acetylchlorid ohne Zusatz einer Base gewinnen. Bei einem Versuch, den Essigsäuremonoester des trans-3,4-Dihydroxy-tetrahydrofurans nach Schotten-Baumann in Pyridin herzustellen, fiel eine reichliche Menge des entsprechenden Diesters an. Dieser ließ sich durch Umestern mit einem Überschuß an dem Alkohol in saurer Lösung in den Monoester überführen.

Die sterische Einheitlichkeit der cis-trans-Isomeren

Die Carbobenzoxylglycinester des cis- und des trans-Cyclopentandiols zeigen ein fast identisches IR-Spektrum. Es lag daher die Vermutung nahe, daß die cis-trans-Isomeren miteinander verunreinigt waren. Die Verbindungen wurden deshalb auf ihre sterische Einheitlichkeit hin untersucht.

Die dargestellten Glykole sind auf Grund ihrer Darstellung mit Sicherheit einheitlich: Die Oxydation eines Alkens mit Kaliumpermanganat führt nur zum cis-Glykol (oder zu höheren Oxydationsprodukten) und die Verseifung eines Epoxides nur zum trans-Glykol.

Bei der Veresterung der Alkohole mit den Carbobenzoxylaminosäuren ist eine Umkehr der Konfiguration am Alkohol nicht zu erwarten. Die Carbobenzoxylglycinester der Tetrahydrofuranalkohole unterscheiden sich in ihrem Schmelzpunkt und durch ihr IR-Spektrum. Bei den entsprechenden Estern der Cyclopentandiole ist das cis-Isomere fest, das trans-Isomere flüssig. Das letztere läßt sich nicht durch Animpfen mit dem cis-Ester zum Kristallisieren bringen.

Bei den Glycinestern spricht für die Einheitlichkeit die Tatsache, daß die cis-Isomeren als neutrale, die trans-Isomeren dagegen als saure Salze vorliegen. Kristallisiert man ein Gemisch der Glycinester des cis- und trans-3,4-Dihydroxy-tetrahydrofurans mit einem Überschuß an Oxalsäure um, so erhält man nach Oxalsäuregehalt und Schmelzpunkt wieder das Gemisch zurück. Bei den Glycinestern der Cyclopentandiole zeigt das Gemisch nach einer entsprechenden Behandlung in bezug auf Schmelzpunkt und Oxalsäuregehalt die Eigenschaften des sauren Salzes. Das ist neben dem oben erwähnten IR-Spektrum ein weiterer Hinweis auf eine mögliche gegenseitige Verunreinigung der isomeren Glycinester der Cyclopentandiole.

Jedoch läßt sich ein eindeutiger Beweis der sterischen Einheitlichkeit mit Hilfe von Borsäurekomplexen führen: Verbindungen mit cis-ständigen, sterisch günstigen Hydroxylgruppen

bilden mit Borsäure Komplexe, trans-1,2-Glykole nicht. Die Ester wurden deshalb verseift und die Produkte der Hochspannungspapierelektrophorese in Boratpuffer (37) unterworfen. Die cis-Diole wandern im elektrischen Feld, die trans-Diole nicht. - Für die Sichtbarmachung der Glykole auf dem Papier stehen mehrere Methoden zur Verfügung. Eine der einfachsten ist die Oxydation der Glykole mit Perjodsäure und die Entwicklung mit Benzidin (38). - Durch die Elektrophorese konnte sichergestellt werden, daß die nach der Synthese zu erwartenden Ester in reiner Form vorlagen, auch im Fall der Glycinerester der Cyclopentandiole.

Kinetische Messungen

Ein Maß für die Reaktionsfähigkeit einer Substanz ist die Geschwindigkeit, mit der diese eine chemische Reaktion eingeht. Um verschiedene Substanzen in ihrer Reaktionsfähigkeit zu vergleichen, muß man sie denselben Reaktionen unterwerfen und dabei alle Bedingungen möglichst konstant halten. Für Ester kann man die Verseifung und die Reaktion mit Hydroxylamin heranziehen.

Ester können sauer oder alkalisch verseift werden. Für kinetische Messungen ist die alkalische Verseifung vorzuziehen, weil sie im allgemeinen bis zu Ende verläuft, da die Hydroxid-Ionen das Gleichgewicht fast quantitativ zugunsten der Verseifungsprodukte verschieben. Die alkalische Verseifung ist meist eine Reaktion zweiter Ordnung. Hält man jedoch die Konzentration der Hydroxid-Ionen konstant, so verläuft sie nach der ersten Ordnung (pseudomonomolekular). Die Konzentration der Hydroxid-Ionen kann man durch Arbeiten in einem Puffer oder, wie in dieser Arbeit, mit Hilfe eines Autotitrators konstant halten, der ein Absinken des pH-Wertes durch automatische Zugabe von Lauge ausgleicht. Der zeitliche Verlauf der Zugabe wird registriert, und man erhält eine Kurve, die die Abnahme der Konzentration an Ester in Abhängigkeit von der Zeit wiedergibt (Abb. 3, S. 21).

Durch Veränderungen des pH-Wertes, bei dem die Verseifung durchgeführt wird, läßt sich die Reaktionsgeschwindigkeit weitgehend variieren. Erhöht man z.B. den pH-Wert um eine Einheit, wird die Reaktionsgeschwindigkeit verzehnfacht. Die pH-Werte 9,8 und 11,5, sowie die Temperatur 30° haben sich als sehr günstig für die Verseifung erwiesen. Niedere pH-Werte sind ungeeignet, weil dann die Reaktionen zu langsam verlaufen. Das ist insofern von Nachteil, als sich bei pH 9,8 und 11,5 eine Absorption von Kohlendioxid aus der Luft bemerkbar macht, auch wenn man die Versuchslösung mit Toluol überschichtet. Arbeitet man unter Stickstoff, ist eine Störung kaum noch feststellbar. Nur bei den sehr langsam verseifenden Estern macht sich noch ein Fehler bemerkbar. Diese Werte sind deshalb nicht in die Tabellen aufgenommen worden.

Die bei der Verseifung eines Aminosäureesters verbrauchte Menge Lauge ist nicht der Menge zersetzten Esters äquivalent, und zwar deshalb, weil die Aminogruppe einer freien Aminosäure einen anderen pK-Wert besitzt als die ihres Esters. Glycin z.B. hat die pK-Werte 2,31 für die Carboxylgruppe und 9,72 für die Aminogruppe. Der pK-Wert des Glycinesters ist 7,73, d.h. der Ester liegt bei dem einen für die Verseifung gewählten Fall von pH 9,8 fast vollständig in der Neutralform vor, während die Aminogruppe der freien Säure unter diesen Bedingungen zu etwa 50% protonisiert ist. Bei der Verseifung entsteht also eine stärkere Base, die aus dem Wasser Hydroxid-Ionen in Freiheit setzt und damit die zur Verseifung nötige Menge Lauge verringert. Die verbrauchte Laugenmenge ist jedoch bei konstantem pH-Wert der Menge des verseiften Esters proportional, so daß die Lauge-Zeit-Kurve für kinetische Auswertungen benutzt werden kann.

Mit Hydroxylamin reagieren die Ester unter Bildung von Hydroxamsäuren, die mit Eisen(III)-chlorid einen intensiv roten Komplex bilden. Mit dessen Hilfe kann man die Entstehung der Hydroxamsäuren aus den Estern photometrisch verfolgen.

Die Reaktion mit Hydroxylamin kann auf zwei Wegen verlaufen (40) (s.u.). Unter den hier gewählten Bedingungen (großer Hydroxylaminüberschuß) ist in jedem Fall eine Reaktion erster Ordnung zu erwarten. - Die Geschwindigkeit der Hydroxylaminreaktion läßt sich durch Veränderung der Temperatur, der Hydroxylaminkonzentration und des pH-Wertes innerhalb gewisser Grenzen variieren. Darüber hinaus wirkt die Gegenwart von Phosphat-Ionen unter Umständen reaktionsbeschleunigend (40). Von diesen Möglichkeiten, die Reaktionsgeschwindigkeit zu verändern, mußte Gebrauch gemacht werden, weil sich nicht alle Substanzen unter konstanten Bedingungen mit vergleichbarer Geschwindigkeit umsetzen ließen. Dauert eine Messung zu lange, so sind Störungen durch Verseifung des Esters oder Zersetzung des Hydroxylamins bzw. der Hydroxamsäuren zu erwarten. Geht die Messung zu schnell, wird der Zeitfehler zu groß. Für die Reaktion mit Hydroxylamin wurden folgende Bedingungen gewählt: pH 6,0 und 0°, pH 6,0 und 35°, pH 8,0 und 35°.

Wegen der veränderten Versuchsbedingungen lassen sich nicht alle Werte exakt miteinander vergleichen. Man kann aber eine Substanz unter zwei verschiedenen Bedingungen umsetzen und aus den erhaltenen Resultaten einen Faktor ermitteln, mit dessen Hilfe man die Ergebnisse, die unter den beiden Bedingungen erhalten wurden, umrechnen und miteinander vergleichen kann. Wegen der großen Schwankungsbreite dieses Faktors sind die erhaltenen Werte nur mit Vorbehalt zu benutzen (Tab. 1).

Tab. 1: Ermittlung des Umrechnungsfaktors

Substanz	Hydroxylaminreaktion		f
	pH 6,0 u. 35° 10 ⁴ k	pH 8,0 u. 35° 10 ⁴ k	
 O-Gly	10	71	7,1
 O-Ac OH <i>trans</i>	2,7	34	12
 O-Val OH <i>trans</i>	6,1	20	3,3
 O-Gly OH <i>trans</i>	6,2	31	5,0

Mittelwert: 6,9

Berechnung der k- und t_{1/2}-Werte

Die Bestimmung der Halbwertszeit t_{1/2} bzw. der Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten k einer Reaktion bereitet keine Schwierigkeit, wenn die Reaktion innerhalb eines Zeitraumes zu Ende geht, während dessen alle Bedingungen konstant gehalten werden können, und wenn keine sonstigen Störungen auftreten. Man kann dann die Halbwertszeiten unmittelbar aus den Meßwerten ablesen und aus ihnen k berechnen. Diese Bedingungen sind in den hier beschriebenen Fällen nicht erfüllt: Ein Teil der Reaktionen verläuft zu langsam, und bei der Verseifung und der Hydroxylaminreaktion ist die Einstellung eines konstanten Endwertes aus den oben erwähnten Gründen nicht völlig sicher. Man ist deshalb zur Bestimmung der Halbwertszeiten auf ein Rechenverfahren angewiesen, für das ein Endwert

nicht erforderlich ist. Ein solches Verfahren geht auf Guggenheim zurück (41): Den Kurven, die den Reaktionsablauf wiedergeben, entnimmt man zwei Meßreihen, die die Konzentrationen zu den Zeiten t_1 , t_2 ... und $(t_1 + \tau)$, $(t_2 + \tau)$, ... wiedergeben, wobei $\tau = \text{konst.}$ Für zwei sich entsprechende Werte gilt nach dem Zeitgesetz erster Ordnung:

$$x = A_0 \cdot e^{-kt}$$

$$x = A_0 \cdot e^{-k(t + \tau)}$$

(A_0 = Anfangskonzentration an Ester, x = Konzentration an Ester zur Zeit t , x' = Konzentration an Ester zur Zeit $(t + \tau)$)

Durch Subtraktion der beiden Gleichungen und anschließendes Logarithmieren erhält man:

$$\ln(x - x') = k\tau + \text{konst.}$$

Nach dieser Gleichung kann man rechnerisch k ermitteln oder $\ln(x - x')$ gegen $n \cdot \tau$ auftragen und k der Steigung der Geraden entnehmen ($n = 0, 1, 2, \dots$).

In die Gleichungen gehen die Konzentrationen des Esters zu bestimmten Zeiten ein, während für die Berechnung die Konzentrationen des Verseifungsproduktes bzw. der gebildeten Hydroxamsäure benutzt wird. Mathematisch bedeutet das den Übergang von der Funktion $x = A_0 \cdot e^{-kt}$ auf die Funktion $x = A_0(1 - e^{-kt})$. Die Werte für k bleiben also gleich.

Das Zeitintervall τ soll in der Größenordnung von zwei Halbwertszeiten liegen. Bei einer Reihe von Substanzen (z.B. dem Essigsäureester des Cyclopentanol) liefen die Reaktionen so langsam, daß eine Auswertung der Meßergebnisse nach dem Verfahren nicht mehr als sinnvoll erschien. Diese Substanzen sind deshalb nicht in den Tabellen enthalten.

Die Auswertung der Kurven der Verseifung und der Hydroxylaminreaktion soll an je einem Beispiel dargelegt werden.

Abb. 3 zeigt die Verseifungskurve des Glycinesters des trans-3,4-Dihydroxy-tetrahydrofurans, Tab. 2 (S.21) ihre Auswertung. Aus dem Mittelwert für $\Delta \lg(c - c')$ ergibt sich:

$$k = 3,4 \cdot 10^{-4} \text{ sec}^{-1},$$

daraus berechnet sich die Halbwertszeit $t_{1/2}$ gemäß

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k} \text{ zu } t_{1/2} = 35,9 \text{ Minuten.}$$

Abb. 4 zeigt den Verlauf der Reaktion des Valinesters des cis-3,4-Dihydroxy-tetrahydrofurans mit Hydroxylamin und Tab. 3 (S.22) ihre Auswertung.

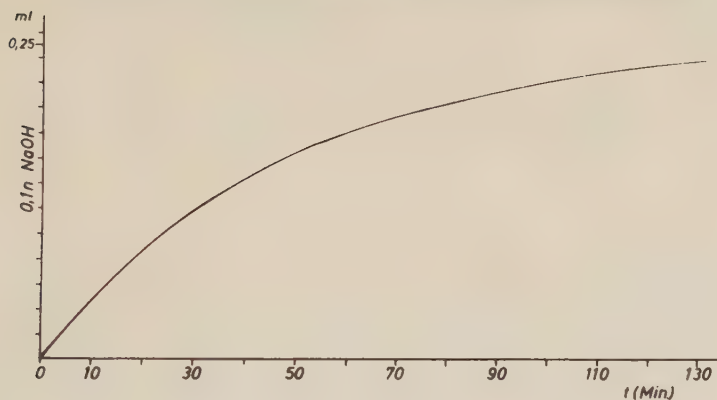
Es ergibt sich $k = 14 \cdot 10^{-4} \text{ sec}^{-1}$

und $t_{1/2} = 8,4 \text{ Minuten.}$

Die Tabellen 10 bis 13 S. 53-58 geben einen Überblick über die untersuchten Substanzen und die erhaltenen Werte für k und $t_{1/2}$. - Der Fehler, mit dem diese Werte behaftet sind, läßt sich nicht exakt berechnen, weil die Fehlermöglichkeiten weitgehend durch die benutzten Apparate bestimmt sind und sich nicht genau erfassen lassen. Wie sich aus wiederholten Messungen ergab, liegt der Fehlerbereich zwischen 5 und 10 Prozent.

Abb. 3

Verseifung des Glycinmonoesters des *trans*-3,4-Dihydroxy-tetrahydrofurans
($p_H 9,8$; $30^\circ C$).



Tab. 2: Auswertung der in Abb. 3 dargestellten Kurve.

t (Min.)	t+ τ (Min.)	c	c'	c-c'	lg(c-c')	$\Delta \lg(c-c')$
0	65	0	9,4	9,4	0,973	
5	70	1,3	9,7	8,4	0,924	0,049
10	75	2,5	10,05	7,55	0,878	0,046
15	80	3,4	10,3	6,9	0,839	0,039
20	85	4,3	10,55	6,25	0,796	0,043
25	90	5,1	10,7	5,6	0,748	0,048
30	95	5,8	10,9	5,1	0,708	0,040
35	100	6,5	11,1	4,6	0,662	0,046
40	105	7,1	11,25	4,15	0,618	0,044
45	110	7,7	11,45	3,75	0,574	0,044
50	115	8,2	11,6	3,4	0,531	0,043
55	120	8,7	11,75	3,05	0,484	0,047
60	125	9,05	11,9	2,85	0,455	0,029

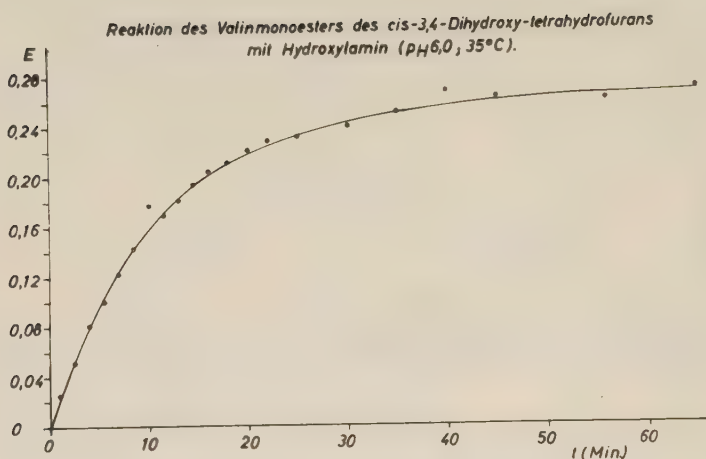
Mittelwert: 0,042

(c = Menge zugegebener Natronlauge zur Zeit t

c' = Menge zugegebener Natronlauge zur Zeit t+ τ

Die Menge Natronlauge ist nicht in ml angegeben, sondern in cm der y-Achse der vom Autotitrator gelieferten Kurve. 25 cm entsprechen 0,5 ml 0,1 n Natronlauge.)

Abb. 4



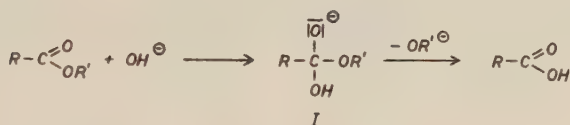
Tab. 3: Auswertung der in Abb. 4 dargestellten Kurve

t (Min.)	t+ τ (Min.)	E	E'	E - E'	lg(E-E')	$\Delta\lg(E-E')$
0	27,5	0	0,240	0,240	0,380-1	
2,5	30	0,048	0,244	0,196	0,292-1	0,088
5	32,5	0,094	0,248	0,154	0,188-1	0,104
7,5	35	0,130	0,252	0,122	0,086-1	0,102
10	37,5	0,156	0,255	0,099	0,995-2	0,091
12,5	40	0,178	0,257	0,079	0,879-2	0,098
15	42,5	0,195	0,260	0,065	0,812-2	0,085
17,5	45	0,207	0,261	0,054	0,732-2	0,080
20	47,5	0,218	0,262	0,044	0,643-2	0,089
22,5	50	0,227	0,263	0,036	0,556-2	0,087
25	52,5	0,234	0,264	0,030	0,477-2	0,079
Mittelwert:						0,090

(E = Extinktion in Photometereinheiten.)

Versuchsergebnisse und ihre Deutung

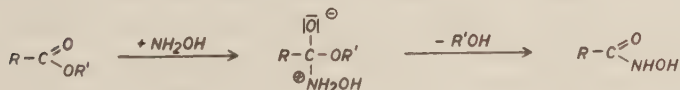
Die Hydrolyse der hier beschriebenen Ester verläuft nach dem Carbonyl-Additionsmechanismus unter Acyl-Sauerstofftrennung:



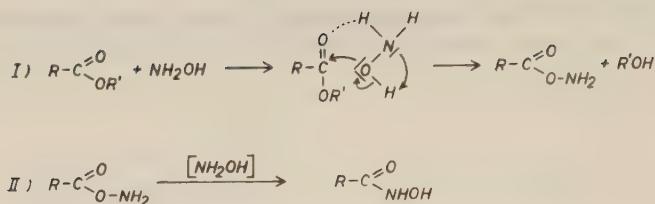
Die Zwischenstufe I ist negativ geladen; elektropositive Substituenten R oder R', die das Carbonyl-Kohlenstoffatom positivieren (z.B. durch einen induktiven Effekt), führen deshalb zu einer Reaktionsbeschleunigung, elektronegative Substituenten verzögern entsprechend die Reaktion. Da die Verseifung nach einem bimolekularen Mechanismus verläuft, können nahe am Reaktionszentrum stehende Substituenten eine sterische Hinderung der Reaktion bewirken.

Für die Reaktion von Estern mit Hydroxylamin gibt es nach Jencks (40) zwei Möglichkeiten:

1. Die direkte N-Acylierung des Hydroxylamins. Sie unterscheidet sich von der Esterverseifung nur dadurch, daß an die Stelle des Hydroxid-Ions das Hydroxylamin tritt:



2. Die O-Acylierung des Hydroxylamins und die anschließende Reaktion der O-Acylverbindung mit einem zweiten Molekül Hydroxylamin unter Hydroxamsäurebildung:



Schritt II ist reaktionsbestimmend und gehorcht einem Zeitgesetz erster Ordnung. Er verläuft der Esterverseifung analog.

Die Hydroxylaminreaktion ist also in ihrem Mechanismus der Esterverseifung sehr ähnlich. Es ist deshalb zu erwarten, daß sich die Unterschiede in der Reaktionsfähigkeit, die sich durch Variation der Substituenten R und R' ergeben, in der gleichen Richtung auswirken wie bei der Verseifung. Es ist jedoch nicht zu erwarten, daß sich die Substituenteneinflüsse auch quantitativ entsprechen. Wie man aus den Tabellen 4 bis 6 sieht, machen sich diese bei der Reaktion mit Hydroxylamin in den meisten Fällen stärker bemerkbar als bei der Verseifung.

Der Einfluß des Fünfringes

Der Glycinerester des Cyclopentanol - eines sekundären Alkohols - reagiert mit Hydroxylamin etwa dreimal langsamer als der des Äthanol (Tab. 13, S. 58). Der Cyclopentanring erschwert aus sterischen Gründen den Angriff des Hydroxylamins am Carbonyl-Kohlenstoffatom. Zu einem vergleichbaren Ergebnis gelangte Skrabal, der fand, daß der Essigsäureisopropylester etwa viermal langsamer verseift wird, als der Äthylester (42).

Der Einfluß der nachbarständigen Hydroxylgruppe

Fügt man in den Alkohol in Nachbarstellung zur Estergruppe eine Hydroxylgruppe ein, so steigt die Reaktionsfähigkeit erheblich an und die sterische Hinderung durch den Fünfring wird mehr als ausgeglichen. Wie man aus Tab. 4 ersieht, verseift der

Tab. 4: Einfluß des nachbarständigen Hydroxyls

Substanz	Verseifung bei $pH\ 9,8$		Hydroxylaminreaktion			
	$10^4 k$	$k_{rel.}$	bei $pH\ 6,0$ u. 35° $10^4 k$	$k_{rel.}$	bei $pH\ 8,0$ u. 35° $10^4 k$	$k_{rel.}$
 O-Gly					3,2	1
 O-Gly trans OH	1,2	1	6,2		31	9,7
 O-Gly cis OH	1,5	1,2	5,9			
 O-Ac					5,1	1
 O-Ac trans OH			2,7	1	34	6,7
 O-Ac cis OH			7,1	2,6		
 O-Gly	1,5	1	10	1		
 O-Gly trans OH	3,4	2,3	77	7,7	1	
 O-Gly cis OH	10	6,7	230	23	3,0	
 O-Val					3,1	1
 O-Val trans OH	0,43	1	6,1	1	20	6,5
 O-Val cis OH	1,2	2,8	14	2,3		

Glycinester des trans-3,4-Dihydroxy-tetrahydrofurans 2,3mal schneller als der des 3-Hydroxy-tetrahydrofurans. Dieser Wert steht in guter Übereinstimmung mit dem Befund von Skrabal (42), daß der Essigsäureglykolester etwa 2,5mal schneller verseift wird als der Essigsäureäthylester. Bei der Hydroxylaminreaktion sind die Unterschiede wesentlich größer (6,5 : 1 bzw. 6,7 : 1 bei den Derivaten des Tetrahydrofurans, bei denen des Cyclopentanolis ist der Unterschied noch deutlicher: 9,7 : 1 (s.u.)).

Die Erhöhung der Reaktionsfähigkeit durch die nachbarständige Hydroxylgruppe läßt sich hauptsächlich auf zwei Faktoren zurückführen: 1. auf den induktiven Effekt des Sauerstoffs und 2. auf die Ausbildung einer intramolekularen Wasserstoffbrückenbindung von der Hydroxylgruppe zur Ester-carbonylgruppe (54) (Abb. 5c)

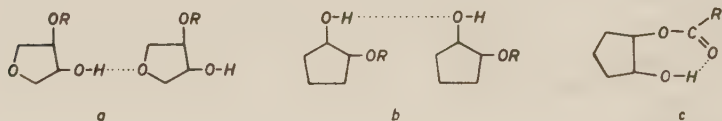


Abb. 5: Zur Ausbildung von inter- (a-b) und intramolekularen (c) Wasserstoffbrücken

Der induktive Effekt sollte sich bei den cis-Glykolestern stärker bemerkbar machen als bei den trans-Estern. Das ist bei den Derivaten der Tetrahydrofuranalkohole auch der Fall: Die Ester der cis-Glykole reagieren sowohl mit Lauge als auch mit Hydroxylamin 2,3- bis 3,0mal schneller als die trans-Verbindungen (Tab. 4). An diesem Unterschied in der Reaktionsfähigkeit können auch Einflüsse durch Wasserstoffbrücken beteiligt sein.

Wasserstoffbrücken sind bei den cis- und trans-Dioleestern räumlich möglich, und zwar bei den trans-Isomeren etwas leichter als bei den cis-Isomeren. Sie würden zu einer

stärkeren Positivierung des Carbonyl-Kohlenstoffatoms führen und den nucleophilen Angriff erleichtern (Abb. 6).

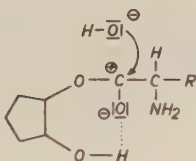


Abb. 6

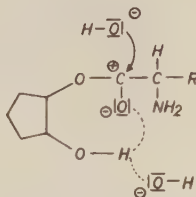


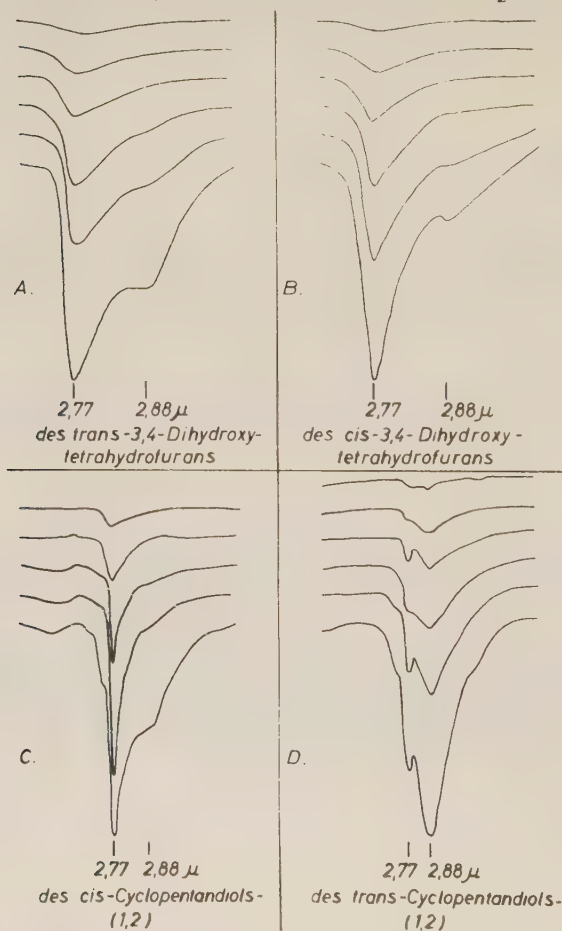
Abb. 6a

Inter- und intramolekulare Wasserstoffbrücken lassen sich IR-spektroskopisch nachweisen. Geht der Wasserstoff einer Hydroxygruppe eine Brückenbindung ein, so treten zusätzlich zur OH-Valenzschwingungsbande ($2,74 - 2,79 \mu$ bzw. $3650 - 3590 \text{ cm}^{-1}$) noch eine bzw. zwei Banden im Bereich von $2,80 - 2,90 \mu$ bzw. $3570 - 3450 \text{ cm}^{-1}$ auf. Inter- und intramolekulare Wasserstoffbrücken lassen sich durch die Spektren einer Verdünnungsreihe voneinander unterscheiden: Die Bande, die auf eine intramolekulare Brücke zurückgeht, verschwindet bei starker Verdünnung, die andere nicht.

Da die Oxalate der Aminosäureester in unpolaren Lösungsmitteln unlöslich sind und außerdem Spektren ohne scharfe Banden bei $2,80 \mu$ bzw. 3650 cm^{-1} besitzen (Abb. 2, S. 13), wurden die Messungen mit den entsprechenden Essigsäureestern durchgeführt. Wie aus den Spektren (Abb. 7 a-d) hervorgeht, ist bei dem Ester des trans-Cyclopentandiols eine intramolekulare Wasserstoffbrückenbindung vorhanden, während sie bei den Estern der Tetrahydrofuranalkohole und des cis-Cyclopentandiols höchstens schwach ausgeprägt (Essigsäureester des trans-3,4-Dihydroxy-tetrahydrofurans) oder nicht mehr nachweisbar ist (Essigsäureester der cis-Glykole). Intramolekulare Wasserstoffbrücken (Abb. 5 a-b) sind jedoch bei den letzten drei Estern vorhanden.

Abb. 7

*OH-Valenzschwingungsbande von Essigsäuremonoestern.
(gemessen in CCl_4 bei verschiedenen Verdünnungen, CaF_2 -Optik)*



Daß auch im Fall der Aminosäureester nur die Ester des trans-Cyclopentandiols(1,2) eine ausgeprägte intramolekulare Wasserstoffbrücke besitzen, läßt sich durch einen Vergleich der Verseifungsgeschwindigkeiten bei verschiedenen pH-Werten sehr wahrscheinlich machen. Je höher die Konzentration an Hydroxid-Ionen ist, desto stärker stören diese die Ausbildung der intramolekularen Wasserstoffbrücken (Abb. 6a, S. 27), durch die - wie erwähnt - die Reaktionsfähigkeit erhöht wird.

Tab. 4a: Abhängigkeit des Verhältnisses der Verseifungsgeschwindigkeiten vom pH-Wert

Substanz	Verseifung	
	bei pH 9,8 <i>k_{rel.}</i>	bei pH 11,5 <i>k_{rel.}</i>
 <i>trans</i>	1	1
 <i>cis</i>	1,2	1,8
 <i>trans</i>	1	1
 <i>cis</i>	2,9	2,7

Tabelle 4 a zeigt, daß bei pH 11,5 das Verhältnis der Reaktionsgeschwindigkeiten für die 3,4-Dihydroxy-tetrahydrofuran-ester etwa das gleiche ist wie bei pH 9,8. Bei den Estern der Cyclopentandiole aber ist - infolge der Auflösung der Wasserstoffbrücke des trans-Isomeren bei steigender Hydroxid-Ionen-Konzentration - das Verhältnis der Verseifungsgeschwindigkeiten vom pH-Wert abhängig. Bei pH 9,8 gleicht die Wirkung der Wasserstoffbrücke beim trans-Isomeren den stärkeren induktiven Effekt beim cis-Isomeren fast aus, so daß beide annähernd

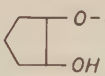
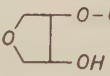
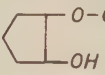
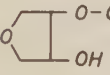
gleich schnell verseift werden. Bei pH 11,5 tritt die Wirkung der intramolekularen Wasserstoffbrücke auf die Verseifungsgeschwindigkeit zurück und das cis-Isomere wird um den Faktor 1,8 schneller verseift.

Der Einfluß des nachbarständigen Hydroxyls auf die Reaktionsfähigkeit von Aminosäureestern wurde gleichzeitig mit dieser Arbeit auch von Wieland, Merz und Pfeleiderer untersucht (45). Es wurde gefunden, daß der (zu 71% reine) Leucinester des cis-Cyclopentandiols(1,2) etwa 1,4mal schneller bei pH 7,8 mit Hydroxylamin reagiert als der Leucinester des trans-Cyclopentandiols(1,2). Als Deutungsmöglichkeit für diesen Unterschied wird die Ausbildung einer intramolekularen Wasserstoffbrücke im cis-Ester diskutiert.

Der Einfluß des Ringsauerstoffs

Der Ersatz einer Methylengruppe im Cyclopentanring durch Sauerstoff führt zu einer starken Erhöhung der Reaktionsfähigkeit der Ester. Die Tetrahydrofuran-derivate werden 2,9- bis 6,7mal schneller bei pH 9,8 verseift als die Cyclopentan-derivate und reagieren mit Hydroxylamin 12- bis 39mal schneller (Tab. 5). Der Einfluß des Ringsauerstoffs ist also stärker als der der nachbarständigen Hydroxylgruppe. Für diese Unterschiede dürfte der induktive Effekt des Sauerstoffs verantwortlich sein.

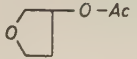
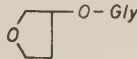
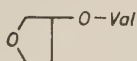
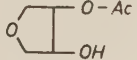
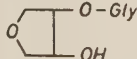
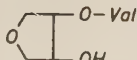
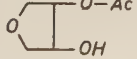
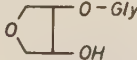
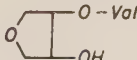
Tab. 5: Einfluß des Ringsauerstoffs

Substanz	Verseifung bei $p_H 9,8$		Hydroxylaminreaktion			
	$10^4 k$	$k_{rel.}$	bei $p_H 6,0$ u. 35° $10^4 k$	$k_{rel.}$	bei $p_H 8,0$ u. 35° $10^4 k$	$k_{rel.}$
 O-Gly					32	1
 O-Gly					71	22
 O-Gly OH trans	1,2	1	6,2	1		
 O-Gly OH trans	3,4	2,8	77	12		
 O-Gly OH cis	1,5	1	5,9	1		
 O-Gly OH cis	10	6,7	230	39		

Der Einfluß der Säurekomponente

In Tabelle 6 ist der Einfluß der Säurekomponente auf die Reaktionsfähigkeit der Ester dargestellt. Die Glycinester reagieren demnach schneller als die Essigsäureester. Das überrascht nicht, denn Ester stärkerer Säuren werden im allgemeinen schneller verseift als die schwächeren Säuren. Die Valinester sind weit weniger reaktiv als die Glycinester. Das hat eine Parallele in der Peptidchemie: Levene, Steiger und Rothen stellten fest, daß Valylglycin innerhalb eines Monats von 0,5 n Natronlauge bei 25° praktisch nicht angegriffen wird,

Tab. 6: Einfluß der Säurekomponente

Substanz	Verseifung bei $p_H 9,8$		Hydroxylaminreaktion			
	$10^4 k$	$k_{rel.}$	bei $p_H 6,0$ u. 35° $10^4 k$	$k_{rel.}$	bei $p_H 8,0$ u. 35° $10^4 k$	$k_{rel.}$
 O-Ac					5,1	1 1,6
 O-Gly					71	14 23
 O-Val					3,1	0,6 1
 O-Ac trans			2,7	1		
 O-Gly trans	3,4	7,9	77	29 13		
 O-Val trans	0,43	1	6,1	2,3 1		
 O-Ac cis			7,1	1		
 O-Gly cis	10	8,3	230	32 16		
 O-Val cis	1,2	1	14	2,0 1		

während Glycylglycin in dieser Zeit zu etwa einem Drittel hydrolysiert wird (43).

Faßt man alle Einflüsse zusammen, so ergibt sich folgendes Bild (Tab. 7):

Tab. 7: Zusammenfassung aller Einflüsse

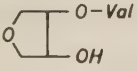
Substanz	Verseifung bei $pH\ 9,8$		Hydroxylaminreaktion			
	$10^4 k$	$k_{rel.}$	bei $pH\ 6,0$ u. 35° $10^4 k$	$k_{rel.}$	bei $pH\ 8,0$ u. 35° $10^4 k$	$k_{rel.}$
Glycinäthylester	0,79	1	1,4 ^{x)}	1	10	1
 -O-Gly	—	—	0,46 ^{x)}	0,33	3,2	0,32
 -O-Gly	1,5	1,9	10	7,1	71	7,1
 -O-Gly trans	3,4	4,3	77	55	530 ^{x)}	53
 -O-Gly cis	10	13	230	160	1600 ^{x)}	160

Die mit ^{x)} bezeichneten Werte sind nicht unmittelbar gemessen, sondern mit Hilfe des Faktors f (Tab. 1, S. 18) aus anderen Meßergebnissen errechnet.

Der Glycinester des cis-3,4-Dihydroxy-tetrahydrofurans reagiert etwa 13mal schneller mit Natronlauge bei $pH\ 9,8$ und 160mal schneller mit Hydroxylamin als der Glycinester des Äthanol. Wählt man nicht den Äthylester, sondern den Cyclopentanolster als Bezugssubstanz, so sind die Faktoren noch erheblich größer: etwa 40 für die Verseifung und 520 für die Hydroxylaminreaktion. Für die entsprechenden Valinester darf man ähnliche Unterschiede annehmen, obwohl es nicht möglich war, sie unter annähernd gleichen Bedingungen zu messen.

Valyladenosinester (16) reagiert mit Natronlauge nur noch 5mal und mit Hydroxylamin 8,7mal schneller als der Valinester des cis-3,4-Dihydroxy-tetrahydrofurans (Tab. 8). Diese

Tab. 8: Vergleich des Valinesters des cis-3,4-Dihydroxy-tetrahydrofurans mit Valyladenosin

Substanz	Verseifung bei $pH\ 9,8$		Hydroxylaminreaktion $pH\ 6,0$ u. 0°	
	$10^4 k$	$k_{rel.}$	$10^4 k$	$k_{rel.}$
 <i>cis</i>	1,2	1	0,60	1
Valyladenosin	6,0	5,0	5,2	8,7

Unterschiede sind - namentlich bei der Hydroxylaminreaktion - im Vergleich zu den gefundenen Unterschieden gering. Sie können ihre Ursache in dem Einfluß der Base am C-1 der Ribose oder der Hydroxymethylgruppe am C-4 haben. - Es sind damit also wesentliche Strukturmerkmale gefunden, die die hohe Reaktionsfähigkeit der Aminoacyl-ribonucleinsäure bedingen.

Teil II

Nucleosid-Aminosäureester

Zur Beantwortung der Frage, ob die Aminosäure in der Adenosinendgruppe der Aminoacyl-ribonucleinsäure mit der 2'- oder der 3'-Hydroxylgruppe der Ribose verestert ist (vgl. Einleitung), gibt es zwei Möglichkeiten: Entweder man isoliert das Aminoacyladenosen und ermittelt dessen genaue Struktur durch chemischen Abbau, oder man synthetisiert das 2'- und das 3'-Aminoacyladenosen und vergleicht beide mit dem aus natürlichem Material isolierten Ester.

Ein ähnliches Problem bestand bei der Strukturaufklärung der Phosphorsäureester des Adenosins. 1932 glaubte Levene auf chemischem Wege nachgewiesen zu haben, daß das einzige seinerzeit aus Ribonucleinsäure isolierte Adenosinmonophosphat die 3'-Verbindung sei. Nachdem aber das 2'-Adenosinmonophosphat erhalten worden war und man die leichte Umwandelbarkeit der beiden Isomeren ineinander erkannt hatte, war der Beweis hinfällig. Die eindeutige Strukturermittlung erfolgte erst in den Jahren 1952 - 1954 durch Vergleich der physikalischen Eigenschaften, durch Röntgenstrukturanalyse, sowie durch chemischen Abbau und Synthese (44).

Da auch bei einer chemischen Umwandlung des aus Aminoacyl-ribonucleinsäure isolierten Aminoacyladenosins eine Acylwanderung sehr leicht möglich erscheint, ist es wünschenswert, die reinen isomeren Aminosäureester des Adenosins in einem eindeutig auf die 2'- oder 3'-Stellung gerichteten Weg synthetisch herzustellen, um durch Vergleich der chemischen und physikalischen Eigenschaften eine eindeutige Strukturzuordnung des Aminoacyladenosins aus Aminoacyl-ribonucleinsäure zu treffen. Die Herstellung von Aminosäureestern des Adenosins ist bereits früher beschrieben worden (16, 45). Bei diesen synthetischen Estern blieb jedoch offen, ob ein Gemisch aus 2'- und 3'-Ester vorlag oder ein einheitliches Isomeres.

Herstellung von 5'-Aminoacyladenosen

Sehr leicht läßt sich 5'-Valyladenosen herstellen. Als Ausgangsmaterial eignet sich cyclisches Adenosin-2',3'-monophosphat bzw. 2',3'-Isopropylidenadenosen. Aus beiden Substanzen

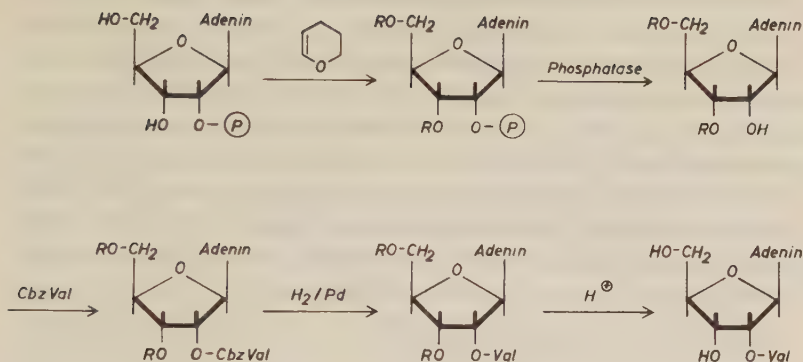
lassen sich die Schutzgruppen leicht enzymatisch oder durch Säure abspalten. Die Veresterung des 2',3'-Isopropylidenadenosins mit Carbobenzoxyvalin und die Isolierung des Esters gelingt nach den im Teil I beschriebenen Methoden. N,N'-Dicyclohexyl-carbodiimid lieferte in Vorversuchen ein weit besseres Resultat als N,N'-Carbonyl-di-imidazol. Das 5'-Carbobenzoxyvalyl-2',3'-isopropylidenadenosin existiert in zwei Modifikationen. Engt man seine Lösung in Chloroform zur Trockne ein, so erhält man es als eine glasartige, farblose Substanz, die zwischen 60 und 70° schmilzt. In dieser Form löst sich der Ester leicht in Benzol, fällt aber nach einiger Zeit daraus in kristalliner Form aus. Die Kristalle sind auch in heißem Benzol nicht mehr löslich.

Für die katalytische Hydrierung des Esters war Platin-oxid nach Adams wenig geeignet, weil der Katalysator mit dem Reaktionsgemisch kolloide Lösungen bildete und nur sehr schwer daraus zu entfernen war. Gute Resultate wurden mit einem Palladium(II)-oxid-Bariumsulfat-Katalysator nach Kuhn (46) erhalten. - Die Isolierung des 5'-Valyl-2',3'-isopropylidenadenosins erfolgte über das Oxalat. Die Abspaltung des Isopropylidenrestes gelang mit 0,1 n Salzsäure. Der 5'-Valin-ester des Adenosins wanderte in der Hochspannungselektrophorese einheitlich, zeigte UV-Absorption und reagierte positiv mit Ninhydrin und Perjodat.

Der Versuch, 5'-Glycyladenosin auf dem gleichen Weg herzustellen, führte zu keinem einheitlichen Produkt. Die Abspaltung des Isopropylidenrestes mit 0,1 n Salzsäure auf der letzten Stufe gelang nur zu 19%. Die Verwendung von 1 n Salzsäure führte zur Zersetzung.

Herstellung von 2'- (bzw. 3'-) Valyladenosin

Das Ziel der Syntheseveruche war, ein Gemisch aus 2'- und 3'-Aminoacyladenosen herzustellen, und zwar auf einem Weg, der auch für die Synthese der reinen Isomeren brauchbar ist. Folgender Weg wurde eingeschlagen:



(R = Dihydropyranrest)

Es wurde gefunden, daß sich Dihydropyran in Dimethylsulf-oxidlösung bei höherer Temperatur an Adenosinmonophosphat⁺⁾ anlagern läßt. Bei der Umsetzung entsteht kein reines Produkt, sondern ein Gemisch aus vier Substanzen, von denen keine mit dem Ausgangsmaterial identisch ist und von denen eine mengenmäßig stark überwiegt. Das Substanzgemisch läßt sich mit 1 n Salzsäure momentan oder mit 2 n Essigsäure in etwa einer Stunde wieder spalten; dabei wird das Ausgangsmaterial zurückgewonnen.

Wie sich durch Hochspannungselektrophorese in Boratpuffer und durch Papierchromatographie (47) zeigen ließ, hatte bei der Reaktion die Menge an 2'-Adenosinmonophosphat abgenommen, die an 3'-Adenosinmonophosphat zugenommen. Dieser Befund konnte an dem reinen 2'-Adenosinmonophosphat und dem reinen 3'-Adenosinmonophosphat bestätigt und ergänzt werden. Unter den Bedingungen der Umsetzung tritt bei beiden eine Isomerisierung auf, deren Grad von der Dauer der Reaktion abhängig ist. Bei einer Reaktionszeit von 6 Stunden ist die Isomerisierung gering, nach 72 Stunden hat sich jedoch ein Gleichgewicht eingestellt, welches auf der Seite der 3'-Verbindung liegt.

+) Sofern die Stellung des Phosphatrestes nicht besonders bezeichnet ist, handelt es sich stets um ein Gemisch aus 2'- und 3'-Adenosinmonophosphat.

Für die Abspaltung des Phosphatrestes aus der Adenosinmonophosphat-Dihydropyranverbindung ist die alkalische Verseifung ungeeignet, weil sie wahrscheinlich zu einer Zersetzung der Verbindung führt. Es wurden deshalb Bedingungen für eine enzymatische Abspaltung des Phosphatrestes ausgearbeitet. Setzt man der alkalischen Lösung der Adenosinmonophosphat-Dihydropyran-Verbindung intestinale Phosphatase zu, so wird der Phosphatrest bei 37°, innerhalb von 48 Stunden abgespalten. Durch häufigeren Zusatz von Phosphatase und Lauge, die zur Neutralisation der freigesetzten Phosphorsäure dient, läßt sich die Reaktionsdauer auf 10 Stunden herabsetzen.

Versuche, das Substanzgemisch nach Gefriertrocknung durch Gegenstromverteilung zwischen Chloroform bzw. Benzol und 0,1 n Ammoniak zu trennen, führten nicht zum Ziel. Das Reaktionsprodukt ließ sich in verdünnter Lauge lösen, dem zur komplexen Bindung des Magnesiums Äthylendiamintetraessigsäure zugesetzt war. Aus dieser Lösung konnte durch Extrahieren mit Diisopropyläther ein Gemisch aus zwei Substanzen isoliert werden, welches sich durch Chromatographie an Kieselgel weitgehend zerlegen ließ. Die Substanz, die in der Chromatographie schneller läuft, wurde mit I, die andere mit II bezeichnet. Bei der Hochspannungselektrophorese in Boratpuffer zeigen beide Substanzen keine Wanderung, sie reagieren nicht mit Perjodat. Aus diesen Befunden und dem Syntheseweg geht hervor, daß es sich bei den Substanzen um Adenosinderivate handelt, bei denen eine der beiden cis-ständigen Hydroxylgruppen mit Dihydropyran geschützt und die zweite frei ist. Die 5'-Hydroxylgruppe dürfte ebenfalls geschützt sein. Ob sich die Konstitution der beiden Substanzen durch die Stellung des Dihydropyran-Restes am C-Atom 2 bzw. 3 der Ribose unterscheidet, ist nicht gesichert.

Beide Substanzen wurden für Veresterungsversuche nach den erwähnten Methoden benutzt. Bei der Umsetzung von Substanz II mit Carbobenzoxyvalin und N,N'-Carbonyl-di-imidazol konnte in dem Reaktionsgemisch mittels der Dünnschichtchromatographie eine Substanz nachgewiesen werden, die hydrophober war als das Ausgangsmaterial, und bei der es sich wahrscheinlich um den Carbobenzoxyvalinester der Dihydropyran-Adenosin-Verbindung

handelt. Durch Chromatographie des Reaktionsproduktes an Kieselgel gelang es, das Ausgangsmaterial weitgehend zu entfernen und die Substanz stark anzureichern. Nach der Hydrierung des Produktes konnten mit der Hochspannungselektrophorese in Citratpuffer zwei Substanzen nachgewiesen werden, die die Eigenschaften der gesuchten Aminosäure-Adenosin-Ester besitzen: Nach der Absorption im UV enthalten sie Adenosin und mit der Ninhydrinreaktion läßt sich die Aminosäure nachweisen. Da die Substanzen nicht mit Perjodat reagieren, ist zu schliessen, daß eine der beiden cis-ständigen Hydroxylgruppen substituiert ist. Die beiden Substanzen dürften sich dadurch unterscheiden, daß die eine noch Dihydropyran enthält, die andere nicht.

Eine Erhöhung der Ausbeute an Carbobenzoxyvalin-Ester gelang weder durch Veränderung der Mengenverhältnisse der Reaktionspartner, noch durch Änderung der Reaktionsdauer oder der Temperatur. Auch Versuche, die Reaktion durch Zusatz verschiedener Basen alkalisch zu katalysieren (48), ergab keine Verbesserung der Ausbeute. Der Ersatz von N,N'-Carbonyl-diimidazol durch N,N'-Dicyclohexyl-carbodiimid oder N-Äthyl-5-phenylisoxazolium-3-sulfonat (Woodwards Reagenz) (49) führte nicht zu dem gesuchten Produkt.

Die Kondensation von Carbobenzoxyvalin und geschützten Adenosinverbindungen mit Hilfe von N,N'-Carbonyl-diimidazol und damit die Synthese von Adenosin-Aminosäure-Estern ist demnach auf diesem Wege möglich. Da aber die Ausbeuten niedrig sind und im Verlauf des Syntheseweges eine geringe Isomerisierung stattgefunden hat, ist nicht mit Sicherheit auszuschließen, daß sich das falsche Isomere im Endprodukt angereichert hat. Es sind deshalb keine Aussagen über die Stellung der Aminosäure im synthetisierten Aminoacyladenosen möglich.

Experimenteller Teil

I. Darstellung der Alkohole

a) cis-Cyclopentandiol(1,2).

Cyclopenten wurde mit Kaliumpermanganat in wäßriger Lösung bei 0° (21) oder in alkoholisch-wäßriger Lösung bei -40° (22) oxydiert. Der entstandene Braunstein wurde abzentrifugiert und die klare Lösung auf ca. 300 ml eingengt. Das cis-Cyclopentandiol wurde durch kontinuierliches, zehntägiges Extrahieren mit Chloroform daraus isoliert und durch Destillation gereinigt. Farbloses Öl, $Kp_{0,2} = 66-67^{\circ}$.

b) trans-Cyclopentandiol(1,2) wurde ebenfalls aus Cyclopenten dargestellt (23).

c) cis-3,4-Dihydroxy-tetrahydrofuran.

30 g Mesoerythrit wurden mit 0,5 ml 30%iger Schwefelsäure im Vakuum destilliert. Bei $160-170^{\circ}$ (Badtemperatur) und 0,2 Torr gingen 13 g (51% d.Th.) cis-3,4-Dihydroxy-tetrahydrofuran in Form eines farblosen Öles über (24,25).

d) trans-3,4-Dihydroxy-tetrahydrofuran.

70 g 2,5-Dihydrofuran wurden, wie in Org. Synthesen für Cyclohexen beschrieben (19), mit Perameisensäure oxydiert und der entstandene Ameisensäureester verseift. Die alkalische Lösung wurde mit Essigsäure neutralisiert, im Vakuum zur Trockene eingengt und der Rückstand mehrmals mit Dioxan extrahiert. Die Extrakte wurden getrocknet, das Dioxan abdestilliert und der Rückstand im Vakuum destilliert. $Kp_{17} = 180-185^{\circ}$ (Badtemperatur) Ausbeute 34 g = 33% d.Th.

II. Darstellung der Carbobenzoxyamino-säureester

(Alle angegebenen Ausbeuten sind auf die Carbobenzoxyamino-säure bezogen. Das benutzte Kieselgel war: Kieselgel für Verteilungschromatographie der Firma Merck, Darmstadt, welches durch Zusatz von 15 g Wasser zu 100 g Kieselgel inaktiviert worden war.)

A. Kondensationen mit N,N'-Dicyclohexyl-carbodiimid⁺

a) Carbobenzoxylglycinester des trans-Cyclohexandiols(1,2)

1. 10 mMol Alkohol und 10 mMol Säure wurden in 50 ml Methylenchlorid gelöst und dazu im Verlaufe von 2 Stunden die Lösung von 20 mMol DCC in 20 ml Methylenchlorid gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 3 Tage im Eisschrank aufbewahrt. Der ausgefallene Dicyclohexyl-harnstoff wurde abfiltriert und das Filtrat zur Trockene gebracht. Der Rückstand wurde zur Entfernung überschüssigen DCCs mit Petroläther ausgezogen und der Rest mit Äther extrahiert. Die ätherische Lösung wurde mit einer Natriumhydrogencarbonatlösung gewaschen und der Äther nach Trocknung über Natriumsulfat abgezogen. Der Rückstand zeigte nach Umkristallisieren aus Benzol/Cyclohexan bzw. Methanol/Wasser einen Schmelzpunkt von ca. 145⁰, der sich nach weiterem Umkristallisieren nicht mehr veränderte. - Auch unter anderen Versuchsbedingungen (Raumtemperatur, verdünntere Lösungen) konnte kein einheitliches Produkt erhalten werden.

2. Ein weiterer Reaktionsansatz (1 mMol Alkohol, 1 mMol Säure, 2 mMol DCC in 10 ml Methylenchlorid) wurde 4 Tage stehen gelassen. Nach Entfernen des Dicyclohexyl-harnstoffes und überschüssigen DCCs wurde der Rückstand in Benzol aufgenommen, auf eine Aluminiumoxidsäule (1,5 x 20 cm, Woelm, neutral, Aktivität III) gegeben und mit Benzol eluiert, dem steigende Mengen Aceton zugesetzt wurden. Einheitliche Fraktionen wurden nicht erhalten, auch nicht dadurch, daß das Aceton durch Diisopropyläther ersetzt wurde. In einem anderen Versuch wurde die Chromatographie an saurem Aluminiumoxid (Woelm, Aktivität III) durchgeführt und mit Gemischen von Benzol mit Diisopropyl-

+) N,N'-Dicyclohexyl-carbodiimid ist im folgenden als DCC bezeichnet.

äther im Verhältnis 6:4, 5:5, 4:6, reinem Diisopropyläther und Diisopropyläther-Aceton 7:3 eluiert. Aus den Benzol-Äther (4:6) - und den Äther-Fractionen wurden 100 mg (= 24%) Carbobenzoxylglycylharnstoff (farbl. Kristalle, Schmp. 149°) und aus den letzten Äther- und Äther-Aceton-Fractionen 14 mg (= 5%) des gesuchten Esters isoliert (farblose Kristalle, Schmp. 114°).

Analyse des Acylharnstoffs:

$C_{23}H_{33}N_3O_4$	(415,5)	Ber.	C	66,48	H	8,01	N	10,11
		Gef.	C	66,78	H	7,97	N	10,16

Analyse des Esters:

$C_{16}H_{21}NO_5$	(307,4)	Ber.	C	62,53	H	6,89	N	4,56
		Gef.	C	62,80	H	7,05	N	4,70

Der Gehalt an Carbobenzoxylglycin ergab sich aus dem UV-Spektrum zu 69% (Ber. 68%).

3. Zu einer Lösung von 10 mMol trans-Cyclohexandiol(1,2) und 20 mMol DCC in 3 ml trockenem Pyridin wurden 10 mMol Carbobenzoxylglycin in 3 ml Pyridin zugegeben. Nach 15-stündigem Stehen bei Raumtemperatur wurde das Pyridin im Vakuum abgezogen, überschüssiges DCC mit Petroläther herausgewaschen und der Rückstand in Benzol aufgenommen. Die Benzollösung wurde auf eine Säule (1,5 x 20 cm) von Aluminiumoxid, Woelm, sauer, Aktivität III, gegeben und mit Benzol, Benzol-Diisopropyläther 1:1, Diisopropyläther und Diisopropyläther-Aceton 7:3 eluiert. Aus den Benzol-Diisopropyläther-Fractionen wurde nach Einengen Carbobenzoxylglycylharnstoff in einer Ausbeute von 5% und aus den Diisopropyläther und Diisopropyläther-Aceton-Fractionen der Ester in 20% Ausbeute erhalten. Durch Anwendung eines Überschusses an Alkohol in der Reaktion ließ sich die Ausbeute bis auf 45% steigern.

b) Der Carbobenzoxylglycinester des cis-Cyclohexandiols(1,2) wurde nach der für das trans-Isomere gegebenen Vorschrift (Versuch 3) in einer Ausbeute von 20% hergestellt. Farblose Kristalle, Schmp. 78°.

Analyse:

$C_{16}H_{21}NO_5$ (307,4) Ber. C 62,53 H 6,89 N 4,56
Gef. C 62,83 H 6,71 N 4,84

Der Gehalt an Carbobenzoxyglycin ergab sich aus dem UV-Spektrum zu 68% (Ber. 68%).

c) Carbobenzoxyglycinester des trans-3,4-Dihydroxy-tetrahydrofurans.

Versuch 1.

6,6 mMol Diol, 3,3 mMol Carbobenzoxyglycin und 6,6 mMol DCC wurden in 10 ml Pyridin wie unter a) Versuch 3 beschrieben, umgesetzt und chromatographiert. Dabei konnte aus den Diisopropyläther-Fractionen eine geringe Menge Diester isoliert werden, der nach Umkristallisieren aus Methanol bei 124° schmolz. Aus den folgenden Fractionen wurden nach Abdampfen der Lösungsmittel farblose Öle erhalten, die wahrscheinlich Monoester enthielten, aber nicht zum Kristallisieren gebracht werden konnten.

Analyse des Diesters:

$C_{24}H_{26}N_2O_9$ (486,5) Ber. C 59,25 H 5,39 N 5,76
Gef. C 59,23 H 5,29 N 5,65

Gehalt an Carbobenzoxyglycin: 87% (Ber. 86%).

Versuch 2.

Zu einer Lösung von 4 mMol Säure und 4,8 mMol Diol in 5 ml trockenem Pyridin wurde die Lösung von 8 mMol DCC in 5 ml Pyridin gegeben und die Mischung 2 Tage bei Raumtemperatur stehen gelassen. Das Pyridin wurde am Rotationsverdampfer entfernt, aus dem Rückstand überschüssiges DCC mit Petroläther herausgewaschen und das zurückgebliebene Öl in Chloroform aufgenommen. Der Dicyclohexylharnstoff wurde abfiltriert, das Filtrat auf eine Kieselgelsäule (3 x 50 cm) aufgetragen und mit Chloroform-Aceton 85/15 eluiert. Ausbeute an Monoester 1,6 mMol = 40%. Farblose Kristalle, Schmp. 66°.

Analyse:

$C_{14}H_{17}NO_6$ (295,3) Ber. C 56,94 H 5,80 N 4,74

Gef. C 57,18 H 5,93 N 4,89

Gehalt an Carbobenzoxylglycin: 72% (Ber. 71%).

B. Kondensationen mit N,N'-Carbonyl-di-imidazol

a. Herstellung des Reagenzes

N,N'-Carbonyl-di-imidazol wurde nach der von Staab gegebenen Vorschrift (33) hergestellt. Es wurde die in Abb. 8 skizzierte Apparatur benutzt, die kurz vor der Benutzung

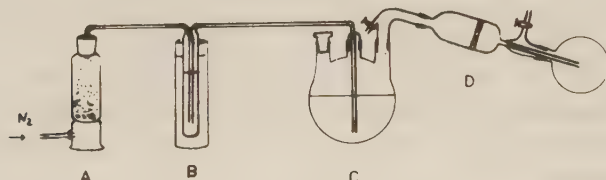


Abb. 8: Apparatur zur Herstellung von N,N'-Carbonyl-di-imidazol

durch Flammen scharf getrocknet wurde. Die berechnete Menge Phosgen wurde in einer Waschflasche B kondensiert und mit einem Stickstoffstrom, der einen mit Calciumchlorid gefüllten Trockenturm A passierte, in die Imidazolllösung im Kolben C übergetrieben. Nach beendeter Reaktion wurde mit Hilfe einer Fritte D das Imidazolhydrochlorid abfiltriert und das Filtrat im Vakuum zur Trockene gebracht. Der Rückstand wurde ohne weitere Reinigung für die Kondensationen verwendet.

b. Darstellung der in Tab. 9 (S. 45) aufgeführten Ester.

Die in Tab. 9 angegebene Menge Carbobenzoxylglycin bzw. -valin (50) in 30 ml Tetrahydrofuran wurde mit N,N'-Carbonyl-di-imidazol im Molverhältnis 1:1,1 versetzt und 1 Stunde unter Rückfluß erwärmt. Nach Zusatz der Lösung des Alkohols (ebenfalls 1,1 Mol auf 1 Mol Säure) in 10 ml Tetrahydrofuran wurde eine weitere Stunde unter Rückfluß erhitzt und das Te-

Tab. 9: Übersicht über die dargestellten Carboben-
oxyaminosäureester

Substanz	eingesetzte Menge Säure	Gesamt - ausbeute	Ausbeute an reinem Monoester	Beschreibung der Substanz
 O-(Cbz - Gly)	20 m Mol	81 %	81 %	farbl. Öl
 O-(Cbz - Val)	15 m Mol	30 %	30 %	farbl. Öl
 O-(Cbz - Gly) trans OH	21 m Mol	≈ 100 %	60 %	farbl. Öl
 O-(Cbz - Gly) cis OH	15 m Mol	73 %	41 %	farbl. Kristalle (aus Benzol / Petroläther) Schmp. 63,5 - 65°
 O-(Cbz - Gly)	20 m Mol	89 %	89 %	farbl. Öl
 O-(Cbz - Val)	15 m Mol	91 %	91 %	farbl. Öl
 O-(Cbz - Gly) trans OH	15 m Mol	73 %	32 %	farbl. Kristalle (aus Toluol) Schmp. 66°
 O-(Cbz - Val) trans OH	21 m Mol	90 %	52 %	farbl. Öl
 O-(Cbz - Gly) cis OH	30 m Mol	67 %	32 %	farbl. Kristalle (aus Benzol / Petroläther) Schmp. 71°
 O-(Cbz - Val) cis OH	21 m Mol	94 %	61 %	farbl. Öl

trahydrofuran anschließend am Rotationsverdampfer entfernt. Der Rückstand wurde in 50 ml Chloroform aufgenommen und die Lösung 2mal mit je 20 ml gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung, danach 3mal mit je 20 ml Wasser extrahiert. Die über Natriumsulfat getrocknete Chloroformlösung wurde auf eine Kieselgelsäule (3 x 50 cm) aufgetragen und mit Chloroform-Aceton 85/15 eluiert. Die einzelnen Fraktionen (je 13 ml) wurden mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie getestet (s.u.). Die

Fraktionen, die nur Monoester enthielten, und die, die außer Mono- noch Diester enthielten, wurden zusammengespült. Das Lösungsmittel wurde im Rotationsverdampfer weitgehend entfernt. Die zurückbleibenden Öle wurden 2 Stunden bei 0,5 Torr getrocknet. Die Gewichte der so erhaltenen Öle bzw. Kristalle wurden der Ausbeutebestimmung zugrunde gelegt (Tab. 9).

c. Der Carbobenzoxymono- und der entsprechende -diester des trans-3,4-Dihydroxy-tetrahydrofurans konnten auch ohne Chromatographie in ziemlich reiner Form erhalten werden:

15 mMol Carbobenzoxyglycin, 15 mMol N,N'-Carbonyl-di-imidazol und 20 mMol Diol wurden, wie unter b. beschrieben, in Tetrahydrofuran umgesetzt. Nach Entfernen des Lösungsmittels wurde der Rückstand gründlich mit verdünnter Natriumhydrogencarbonatlösung und Wasser extrahiert, anschließend über Phosphor-pentoxid im Vakuum getrocknet und dann in Methanol gelöst. Nach kurzer Zeit fiel der Diester aus. Die Mutterlaugen wurden eingeengt und der Rückstand mehrmals aus Toluol umgelöst. So wurde der Monoester in kristalliner Form erhalten (Schmp. 62°). Mono- und Diester zeigten in der Dünnschichtchromatographie eine geringe gegenseitige Verunreinigung. Durch Chromatographie des Monoesters an Kieselgel konnte der Schmp. auf 66° gesteigert werden. Ausbeute an Monoester 1,4 g = 32%, an Diester 1,5 g = 41%.

d. Dünnschichtchromatographie.

Die Rohprodukte der Kondensationen sowie Chromatographier- und Kristallisier-Fractionen wurden direkt oder in Methanol-lösung auf die Dünnschichtplatte aufgetragen. Im System Chloroform-Aceton wurde aufsteigend chromatographiert. Danach wurden die Platten 1 Stunde bei 100° bis 120° getrocknet und anschließend 20 bis 30 Minuten in ein Chlorbad gestellt. Nachdem überschüssiges Chlor durch Bewegen der Platten an der Luft vertrieben worden war, wurde mit einer Lösung besprüht, die 1% Kaliumjodid und 1% Stärke enthielt. Die Monoester besitzen niedrigere R_f-Werte als die Diester. Die untere Nachweisgrenze liegt bei 1γ.

III. Hydrierung der Carbobenzoxycarbonsäureester

a. Carbobenzoxycarbonsäureester des trans-Cyclohexandiols(1,2)

1. Versuch

Ein Wasserstoffstrom wurde durch eine Suspension von 100 mg Ester und Platinoxid nach Adams in Diisopropyläther geleitet und anschließend durch eine Bariumhydroxidlösung, um entstandenes Kohlendioxid zu absorbieren. Nach 10 Stunden wurde die Reaktion abgebrochen. Aus dem Ansatz wurden 80% des eingesetzten Produktes zurückgewonnen. Eine teilweise Hydrierung hat jedoch stattgefunden, da sich Bariumcarbonat gebildet hatte. Ähnliche Ergebnisse wurden mit Methanol und Methanol mit etwas Eisessig als Lösungsmittel erhalten.

2. Versuch

100 mg Ester wurden in 10 ml Eisessig gelöst und wie oben hydriert. Nach Entfernen des Eisessigs war ein wasserlösliches Produkt entstanden, welches mit Hydroxylamin reagierte. Es wurde in Wasser gelöst und an dem schwach basischen Ionenaustauscher Amberlite IRC 50 (H^+ -Form) chromatographiert. Mit Wasser kam ein farbloses Öl von der Säule und mit 0,01 n Salzsäure ein festes Produkt. Beide gaben eine schwach positive Hydroxylaminreaktion. Analoge Ergebnisse wurden mit dem cis-Isomeren erhalten.

b. Carbobenzoxycarbonsäureester des trans-3,4-Dihydroxy-tetrahydrofurans

α. Isolierung des essigsäuren Salzes

1 g Ester wurde in 10 ml Eisessig bei Raumtemperatur und geringem Überdruck mit Wasserstoff und Platinoxid nach Adams als Katalysator hydriert. Die Reaktion wurde in einer geschlossenen Apparatur durchgeführt, in der sich ein Gemisch von Calciumoxid und Kaliumhydroxid zur Adsorption des entstehenden Kohlendioxids befand. Nach beendeter Wasserstoffaufnahme wurde der Katalysator abzentrifugiert und der Eisessig durch Gefriertrocknung entfernt. Das Acetat des Glycinesters blieb

als Öl zurück, welches bei Behandlung mit Methylenchlorid kristallisierte. Das Acetat konnte aus Eisessig/Methylenchlorid umkristallisiert werden. Farblose Nadeln, Schmp. (unter Zersetzung) 118° . Bei längerem Aufbewahren im Vakuum tritt Verlust von Essigsäure ein. Ausbeute der Hydrierung 92%.

Analyse

$C_6H_{11}NO_4 \cdot CH_3COOH$ (221,2) Ber. C 43,40 H 6,83 N 6,33
Gef. C 43,47 H 6,93 N 6,22

B. Überführung des Acetates in das Oxalat

Das Acetat wurde in Äthanol gelöst und ein Überschuß an alkoholischer Oxalsäurelösung hinzugegeben. Nach Zusatz von Äther fiel der Ester als Oxalat aus und wurde aus Äthanol/Äther umkristallisiert.

γ. Bestimmung des Oxalsäuregehaltes

10 bis 20 mg Ester wurden in 5 ml Wasser gelöst, mit Schwefelsäure angesäuert und einige Körnchen Mangan(II)-sulfat zugegeben. Die etwa $60-70^{\circ}$ warme Lösung wurde mit 0,01 n Kaliumpermanganatlösung titriert.

2. Hydrierung der Carbobenzoxyaminosäureester unter Überführung der Hydrierungsprodukte in die Oxalate.

Je 1 g Carbobenzoxyaminosäureester wurde, wie oben beschrieben, (1α), hydriert. Die Acetate wurden nicht zur Kristallisation gebracht, sondern direkt in die Oxalate übergeführt. Die Ausbeuten lagen zwischen 40 und 90%.

Übersicht über die hergestellten Aminosäureester. (Alle Substanzen sind farblos und zersetzen sich beim Schmelzpunkt):

1. Glycinester des Cyclopentanol, Schmp. $165-167^{\circ}$.

$C_7H_{13}NO_2 \cdot H_2C_2O_4$ (233,2)
Ber. C 46,35 H 6,48 N 6,01 $H_2C_2O_4$ 38,6
Gef. C 46,00 H 6,35 N 6,09 $H_2C_2O_4$ 39,8

2. Valinester des Cyclopentanolis, Schmp. 165-167°.

$C_{10}H_{19}NO_2 \cdot H_2C_2O_4$ (275,3)

Ber. C 52,35 H 7,69 N 5,09 $H_2C_2O_4$ 32,7

Gef. C 52,43 H 7,57 N 5,20 $H_2C_2O_4$ 33,2

3. Glycinester des trans-Cyclopentandiols(1,2), Schmp. 135-137°.

$C_7H_{13}NO_3 \cdot H_2C_2O_4$ (249,2)

Ber. C 43,37 H 6,07 N 5,62 $H_2C_2O_4$ 36,2

Gef. C 43,14 H 5,97 N 5,77 $H_2C_2O_4$ 36,4

4. Glycinester des cis-Cyclopentandiols(1,2), Schmp. 160-161°.

(ab 155° Braunfärbung)

$2C_7H_{13}NO_3 \cdot H_2C_2O_4$ (408,4)

Ber. C 47,05 H 6,91 N 6,86 $H_2C_2O_4$ 22,0

Gef. C 46,81 H 6,74 N 6,98 $H_2C_2O_4$ 21,8

5. Glycinester des 3-Hydroxy-tetrahydrofurans, Schmp. 143-144°.

$C_6H_{11}NO_3 \cdot H_2C_2O_4$ (235,2)

Ber. C 40,85 H 5,57 N 5,96 $H_2C_2O_4$ 38,3

Gef. C 40,88 H 5,64 N 5,64 $H_2C_2O_4$ 38,7

6. Valinester des 3-Hydroxy-tetrahydrofurans, Schmp. 142-143°.

$C_9H_{17}NO_3 \cdot H_2C_2O_4$ (277,3)

Ber. C 47,65 H 6,91 N 5,05 $H_2C_2O_4$ 32,5

Gef. C 47,63 H 6,85 N 5,02 $H_2C_2O_4$ 33,1

7. Glycinester des trans-3,4-Dihydroxy-tetrahydrofurans,
Schmp. 136-137°.

$C_6H_{11}NO_4 \cdot H_2C_2O_4$ (251,2)

Ber. C 38,22 H 5,22 N 5,58 $H_2C_2O_4$ 35,8

Gef. C 38,35 H 5,06 N 5,48 $H_2C_2O_4$ 35,8

8. Valinester des trans-3,4-Dihydroxy-tetrahydrofurans,
Schmp. 136° (sintert ab 130°)

$C_9H_{17}NO_4 \cdot H_2C_2O_4$ (293,3)

Ber. C 45,05 H 6,53 N 4,78 $H_2C_2O_4$ 30,7

Gef. C 44,97 H 6,70 N 4,77 $H_2C_2O_4$ 30,5

9. Glycinester des cis-3,4-Dihydroxy-tetrahydrofurans,
Schmp. 146-147°.

$2C_6H_{11}NO_4 \cdot H_2C_2O_4$ (412,4)

Ber. C 40,78 H 5,87 N 6,79 $H_2C_2O_4$ 21,8

Gef. C 40,78 H 5,71 N 6,51 $H_2C_2O_4$ 22,7

10. Valinester des cis-3,4-Dihydroxy-tetrahydrofurans,
Schmp. 119° (sintert ab 114°).

$C_9H_{17}NO_4 \cdot H_2C_2O_4$ (293,3)

Ber. C 45,05 H 6,53 N 4,78 $H_2C_2O_4$ 30,7

Gef. C 44,96 H 6,59 N 4,85 $H_2C_2O_4$ 29,0

IV. Versuche zur Überprüfung der sterischen Einheitlichkeit der Aminosäureester

A. Kristallisationsversuche

1. Versuch

41 mg Glycinester des cis-Cyclopentandiols(1,2) (neutrales Oxalat) (bzw. 50 mg Glycinester des trans-Cyclopentandiols, saures Oxalat) wurden aus Alkohol/Äther nach Zugabe von 37 mg (25 mg) Oxalsäure ($\cdot 2H_2O$) und noch zweimal ohne Zugabe von Oxalsäure umkristallisiert. Es wurden 70% (85%) der eingesetzten Substanz als neutrales (saures) Oxalat zurückerhalten.

2. Versuch

Ein Gemisch von 20,5 mg Glycinester des cis-Cyclopentandiols und 25 mg Glycinester des trans-3,4-Cyclopentandiols wurde, wie unter 1. angegeben, nach Zusatz von 12,6 mg Oxalsäure 3mal umkristallisiert. Erhalten wurden 39 mg eines sauren Oxalates (Oxalsäuregehalt 36,2% statt 35,7%), welches den Schmelzpunkt des trans-Isomeren zeigte (135-137°).

3. Versuch

Ein Gemisch von 20,6 mg Glycinester des cis-3,4-Dihydroxy-tetrahydrofurans, 25,1 mg Glycinester des trans-3,4-Dihydroxy-tetrahydrofurans und 12,6 mg Oxalsäure wurden der gleichen Be-

handlung wie in Versuch 2 unterworfen. 35 mg eines Gemisches wurden zurückerhalten. Schmp. 128° (cis 146-147 $^{\circ}$, trans 136-137 $^{\circ}$), Oxalsäuregehalt 31,8% (cis 21,8%, trans 35,8%).

B. Verseifung und Elektrophorese in Boratpuffer

Proben der Ester wurden 15 Minuten in 0,2 n Kalilauge erhitzt. Aliquote Teile der verseiften Ester mit 500 μ Mol wurden auf Schleicher u. Schüll - Papier 2043 b aufgetragen und in 0,1 m Kaliumboratpuffer (pH 9,2) der Hochspannungselektrophorese unterworfen (3 Stunden, 80 Volt/cm). Das getrocknete Papier wurde mit einer Lösung von Perjodsäure (46 mg HJO_4 in 4 ml Wasser und 6 ml Aceton) besprüht und nach einer halben Stunde durch eine Benzidinlösung gezogen (1,84 g Benzidin in 44 ml Wasser, 6 ml Eisessig und 950 ml Aceton). Die Diole erscheinen als helle Flecke auf blauem Grund.

V. Herstellung der Essigsäureester

a) 40 mMol Alkohol wurden in 40 ml Tetrahydrofuran gelöst und auf 0° abgekühlt. Unter Rühren und weiterer Kühlung wurden im Laufe von 30 Minuten 38 mMol Acetylchlorid in 20 ml Tetrahydrofuran zugegeben. Nach Stehen über Nacht bei Raumtemperatur wurde das Lösungsmittel im Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand fraktioniert destilliert. Die Ester wurden als farblose Öle in Ausbeuten von 60-70% erhalten.

1. Essigsäureester des Cyclopentanol, $K_{p12} = 45-46^{\circ}$ (51)
2. Essigsäuremonoester des cis-Cyclopentandiols(1,2),
 $K_{pO,2} = 52-53^{\circ}$ (22)
3. Essigsäuremonoester des trans-Cyclopentandiols,
 $K_{pO,2} = 57-58^{\circ}$ (22)
4. Essigsäureester des 3-Hydroxy-tetrahydrofurans,
 $K_{p12} = 62^{\circ}$ (52)
5. Essigsäuremonoester des cis-3,4-Dihydroxy-tetrahydrofurans, $K_{pO,5} = 82-83^{\circ}$
6. Essigsäuremonoester des trans-3,4-Dihydroxy-tetrahydrofurans,
 $K_{pO,3} = 86-87^{\circ}$.

b) In einem Vorversuch wurden 40 mMol trans-3,4-Dihydroxy-tetrahydrofuran mit Acetylchlorid nach Schotten-Baumann in Pyridin umgesetzt. Nach der üblichen Aufarbeitung wurden 2 g Diester erhalten. Zur Umesterung wurden diese in 5 ml Tetrahydrofuran gelöst und dazu die Lösung von 5 g trans-3,4-Dihydroxy-tetrahydrofuran in 0,2 m salzsaurem Tetrahydrofuran gegeben. Nach einer Woche wurde der Monoester durch Destillation des Reaktionsgemisches isoliert.

VI. Kinetische Messungen

Die Einstellung der pH-Werte erfolgte potentiometrisch mit einem Gerät der Firma Radiometer, Kopenhagen (Modell TTT 1). Die Eichung des pH-Meßgerätes erfolgte mit Standardpufferlösungen der Firma Riedel de Haen, Seelze/Hannover.

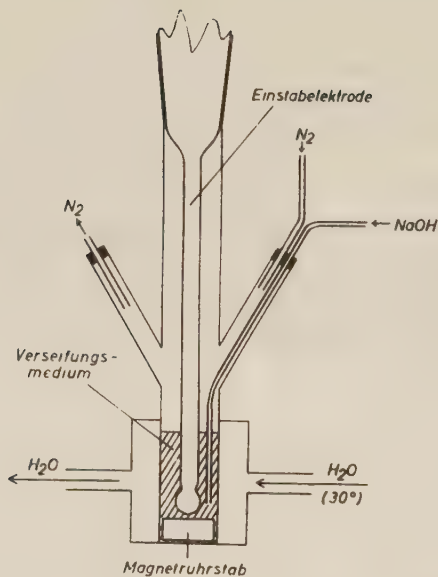
A. Verseifungsgeschwindigkeit

a. Bei pH 9,8

40 μ Mol Ester wurden in 4 ml Wasser gelöst. (Wurde die Verseifungsgeschwindigkeit eines Esters gemessen, der ein neutrales Oxalat bildet, wurden noch 20 μ Mol Oxalsäure zugesetzt.) Das Reaktionsgefäß wurde in einen Kunststoffbehälter gestellt, der von einem Stickstoffstrom durchspült wurde. Die Lösung wurde auf pH 9,8 gebracht und der pH-Wert mit Hilfe eines Autotitrationsgerätes der Firma Radiometer, Kopenhagen (Modell TTT 1 und Ole-Dich-Recorder) durch Zugabe von 0,1 n Natronlauge konstant gehalten. Die erhaltenen Kurven geben die Abhängigkeit des Natronlaugeverbrauchs von der Zeit wieder (Tab. 10).

Tab. 10

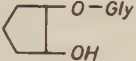
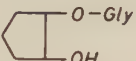
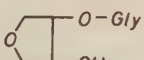
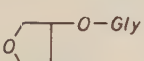
Substanz	Verseifung bei pH 9,8 u. 30°	
	$10^4 k \text{ (sec}^{-1}\text{)}$	$t_{1/2} \text{ (Min.)}$
Glycinäthylester	0,79	150
 <i>trans</i>	1,2	94
 <i>cis</i>	1,5	77
	1,5	75
 <i>trans</i>	3,4	35
 <i>trans</i>	0,43	270
 <i>cis</i>	10	11
 <i>cis</i>	1,2	94



b. Bei pH 11,5.

10 μ Mol Ester wurden in 5 ml Wasser gelöst und in dem oben skizzierten Gefäß bei pH 11,5 mit 0,025 n Natronlauge verseift. Als Autotitrationsgerät diente der Typ TTT 1 mit SBR 2 / SBU 1 der Firma Radiometer, Kopenhagen. Die Ergebnisse zeigt Tab. 10 a.

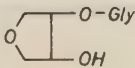
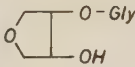
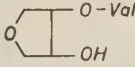
Tab. 10 a

Substanz	Verseifung bei $p_H 11,5$ u. 30°	
	$10^4 k (\text{sec}^{-1})$	$t_{1/2} (\text{Min.})$
 O-Gly OH <i>trans</i>	15	7,7
 O-Gly OH <i>cis</i>	27	4,4
 O-Gly OH <i>trans</i>	52	2,2
 O-Gly OH <i>cis</i>	130	0,82
5'-Valyladenosin	3,2	37
2' (oder 3')-Valyladenosin	67	1,7

B. Reaktion mit Hydroxylamin

Diese Reaktion wurde bei zwei verschiedenen Temperaturen und zwei verschiedenen pH-Werten durchgeführt (0° , 35° ; pH 6,0 und 8,0, Tab. 11 - 13). Das Hydroxylamin wurde als Hydrochlorid in 4 molarer Lösung angewendet, die 0,1 molar an Puffer war. Für den pH-Wert 6,0 wurde ein Collidin-Perchloratpuffer verwendet und für pH 8,0 ein Kaliumphosphatpuffer. Die Einstellung der Lösungen erfolgte potentiometrisch mit Natronlauge.

Tab. 11

Substanz	Hydroxylaminreaktion bei $p_H 6,0$ u. 0°	
	$10^4 k (\text{sec}^{-1})$	$t_{1/2} (\text{Min.})$
 <i>trans</i>	3,2	37
 <i>cis</i>	9,5	12
 <i>cis</i>	0,60	190

30 μMol Ester wurden mit 3 ml der Hydroxylaminlösung versetzt und zu bestimmten Zeiten jeweils 0,1 ml des Reaktionsgemisches in 2 ml Eisen(III)-chloridlösung pipettiert (7,5 proz. $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ in 0,4 n Salzsäure). Die Extinktion des gebildeten Hydroxamsäure-Eisen-Komplexes wurde bei 546 m μ gegen einen Reagenzblindwert im Eppendorf-Photometer gemessen. Die Extinktion ist in dem gewählten Konzentrationsbereich der Konzentration proportional.

Tab. 12

Substanz		Hydroxylaminreaktion bei $p_H 6,0$ u. 35°	
		$10^4 k$ (sec $^{-1}$)	$t_{1/2}$ (Min.)
 <i>O-Gly</i> <i>OH</i> <i>trans</i>		6,2	19
 <i>O-Gly</i> <i>OH</i> <i>cis</i>		5,9	20
 <i>O-Gly</i>		10	11
 <i>O-Ac</i> <i>OH</i> <i>trans</i>		2,7	42
 <i>O-Gly</i> <i>OH</i> <i>trans</i>		77	1,5
 <i>O-Val</i> <i>OH</i> <i>trans</i>		6,1	19
 <i>O-Ac</i> <i>OH</i> <i>cis</i>		7,1	16
 <i>O-Gly</i> <i>OH</i> <i>cis</i>		230	0,51
 <i>O-Val</i> <i>OH</i> <i>cis</i>		14	8,3

Tab. 13

Substanz	Hydroxylaminreaktion bei $pH 8,0$ u. 35°	
	$10^4 k \text{ (sec}^{-1}\text{)}$	$t_{1/2} \text{ (Min.)}$
<i>Glycinäthylester</i>	10	11
 O-Gly	3,2	36
 O-Gly OH <i>trans</i>	31	3,7
 O-Ac	5,1	22
 O-Gly	71	1,6
 O-Val	3,1	37
 O-Ac OH <i>trans</i>	34	3,4
 O-Val OH <i>trans</i>	20	5,7

VII. Darstellung der Nucleosidderivate

Die Mengen an Adenosinderivaten, die in einer Lösung enthalten waren, wurden durch Messung der Absorption im UV bei 260 m μ bestimmt. Die Angaben in Mol beziehen sich also auf Adenosin. Zur Messung der Absorption wurde ein Gerät (PMQ II) der Firma Zeiss, Oberkochen, benutzt.

A. 5'-Valyladenosin

- a) 2 g 2',3'-Isopropylidenadenosin, 4 g Carbobenzoxyvalin und 8 g DCC wurden in 50 ml Pyridin bei Raumtemperatur stehen gelassen. Nach zwei Tagen wurde das Pyridin am Rotationsverdampfer entfernt und überschüssiges DCC mit Petroläther herausgewaschen. Der Rückstand wurde in Chloroform aufgenommen, filtriert, auf eine Kieselgelsäule (90 x 1,8 cm) gebracht und mit Chloroform eluiert. Es wurden 1,5 g Carbobenzoxyvalyl-2',3'-isopropylidenadenosin als glasartige Substanz erhalten. Sie wurde in Benzol gelöst. Nach kurzer Zeit kristallisierte der Ester aus der Lösung aus. Er wurde mehrfach durch Lösung in Chloroform, Entfernen des Chloroforms und Aufnahme in Benzol umkristallisiert (Schmp. 162-164°).
- b) 1 g 5'-Carbobenzoxyvalyl-2',3'-isopropylidenadenosin wurde in 10 ml Eisessig gelöst und nach Zusatz von 2 g PdO-BaSO_4 -Katalysator nach Kuhn (46) hydriert. Die Wasserstoffaufnahme war nach 45 Minuten beendet. Der Katalysator wurde abzentrifugiert und der Eisessig durch Gefriertrocknung entfernt. Der Rückstand wurde in Alkohol gelöst und mit einer alkoholischen Oxalsäurelösung versetzt. Nach Zusatz von Äther fiel der Aminosäureester in Form des Oxalates aus (0,7 g). Zur Abspaltung des Isopropylidenrestes wurde die Substanz in 0,1 n Salzsäure gelöst und 4 Tage bei Raumtemperatur stehen gelassen. Die Salzsäure wurde durch Gefriertrocknung entfernt und der Rückstand nach Zusatz von Oxalsäure mehrmals umkristallisiert, Ausbeute 0,5 g.
- c) Der Ester wurde nach folgenden Methoden charakterisiert:
1. Hochspannungselektrophorese in Citratpuffer.
100 μMol Ester wurden auf Schleicher u. Schüll - Papier 2043 b aufgetragen und der Hochspannungselektrophorese in 0,05 m Citratpuffer unterworfen (1 Stunde, 80 Volt/cm). Das Papier wurde an der Luft getrocknet und durch eine Lösung von 22 mg Perjodsäure in 1 ml Wasser und 30 ml Aceton gezogen. Nachdem es getrocknet war, wurde es mit einer Benzidinlösung entwickelt (vgl. S. 51, B). In einem weiteren Ver-

such wurde das Pherogramm durch eine 2%ige Ninhydrinlösung in Aceton gezogen, getrocknet und auf etwa 100° erhitzt. Es entstand ein violetter Fleck. Die Flecke der UV-Absorption, der Perjodat- und Ninhydrinreaktion zeigten die gleiche Lage im Elektropherogramm. Andere Flecke waren nicht sichtbar.

2. Titration der cis-ständigen Hydroxylgruppen mit Perjodat (53). 22,6 mg 5'-Valyladenosin wurden in etwa 10 ml Wasser gelöst, 2 ml einer gesättigten Natriumhydrogencarbonatlösung zugefügt und mit einem Überschuß an 0,2 m Perjodsäurelösung oxydiert. Der Überschuß an Oxydationsmittel wurde mit Arsenitlösung nach Zusatz von Kaliumjodid-Stärke zurücktitriert. Oxalsäure stört die Reaktion nicht. 98% des Esters lagen in der freien Glykolform vor.

3. Bestimmung des Oxalsäuregehaltes (vgl. S.48 , III b). Der Ester enthielt 20,9% Oxalsäure statt 19,7% der Theorie. Der höhere Gehalt dürfte auf Adsorption von Oxalsäure beruhen.

B. 5'-Glycyladenosin.

Die Herstellung erfolgte wie für das 5'-Valyladenosin beschrieben. Aus 2 g 2',3'-Isopropylidenadenosin und 4 g Carbobenzoxglycin wurden 1,6 g 5'-Carbobenzoxglycyl-2',3'-isopropylidenadenosin erhalten, welches unscharf zwischen 50 und 70° schmolz. Nach Hydrierung von 360 mg des Esters wurden 270 mg Aminosäureester als Oxalat erhalten. Hieraus wurde nach viertägigem Stehen in 0,1 n Salzsäure der Isopropylidenrest nur zu 19% abgespalten, wie die Titration mit Perjodsäure ergab (s. oben, c 2).

C. Dihydropyran-AMP⁺ - und Dihydropyran-Adenosin-Verbindungen.

1. Herstellung der Dihydropyran-AMP-Verbindung.

25 mg AMP wurden in einem Zentrifugenglas in 0,5 ml Dimethylsulfoxid gelöst und dazu 0,5 ml Dihydropyran gegeben. Die Lö-

+) Adenosinmonophosphat wird im folgenden Teil als AMP abgekürzt.

sung wurde etwa 6 Stunden im Wasserbad auf 80-90° erwärmt. Nach Zusatz von 0,5 ml Pyridin wurde Äther zugefügt, bis keine weitere Trübung mehr entstand, zentrifugiert und der Rückstand so lange mit Äther gewaschen, bis er fest war. Nach Trocknen im Vakuum wurden 32-33 mg eines Additionsproduktes erhalten. Entsprechende Ansätze wurden mit Mengen bis zu 10 g AMP durchgeführt. 100 μ Mol des Reaktionsproduktes wurden der Hochspannungselektrophorese (1,5 Stunden, 80 Volt/cm) in Boratpuffer unterworfen (vgl. S. 51). Es traten vier UV-absorbierende Flecke auf, die zwischen den für Adenosin und AMP charakteristischen Flecken lagen.

2. Verseifung und Isomerisierung.

- a. 10 mg der Dihydropyran-AMP-Verbindung wurden in 1 n Salzsäure gelöst. Durch Elektrophorese in Boratpuffer (vgl. oben) ließ sich nur AMP in der Lösung nachweisen. Bei dem Versuch, die Salzsäure durch Gefriertrocknung zu entfernen, färbt sich das Reaktionsgemisch dunkel.
- b. 10 mg Dihydropyran-AMP-Verbindung wurden in 2 n Essigsäure gegeben. Nach etwa einer Stunde war Lösung eingetreten; dabei ist der Dihydropyranrest abgespalten worden, wie sich durch Hochspannungselektrophorese in Boratpuffer zeigen ließ. Die Essigsäure konnte durch Gefriertrocknung entfernt werden, ohne daß Zersetzungserscheinungen auftraten.
- c. Je 10 mg 2'- und 3'-AMP wurden, wie unter C 1 beschrieben, umgesetzt. Die Reaktionszeit betrug einmal 6 Stunden, ein zweites Mal 3 Tage. Nach der Reaktion wurde wie unter b. gespalten und 200 μ Mol des Hydrolyseproduktes der Hochspannungselektrophorese in Boratpuffer unterworfen. Bei den Proben, bei denen vom reinen 2'-AMP ausgegangen worden war, traten auf dem Elektropherogramm stets zwei Flecke auf, die für das 2'- und das 3'-AMP charakteristisch waren. Nach einer Reaktionsdauer von 6 Stunden wurde die Hauptmenge an 2'-AMP zurückgewonnen, nach einer Reaktionsdauer von 3 Tagen war überwiegend 3'-AMP entstanden. Beim 3'-AMP war unter den entsprechenden Bedingungen nach 6 Stunden noch keine

Isomerisierung nachzuweisen, nach 3 Tagen war sie deutlich wahrnehmbar.

Der Versuch wurde wiederholt und die Isomerisierung durch Papierchromatographie bestätigt. Je 25 μMol der Spaltprodukte wurden auf Macherey u. Nagel - Papier MN 2214 F aufgetragen und im System gesätt. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ / $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ / Isopropanol 79/19/2 aufsteigend chromatographiert (47).

3. Abspaltung des Phosphatrestes.

α . Abspaltung

a. 1 g der Dihydropyran-AMP-Verbindung wurde in Wasser gelöst, dabei wurde durch Zugabe von Natronlauge dafür gesorgt, daß der pH-Wert nicht über 8,0 stieg. Nach Zusatz von 40 mg Enzym (Intestinal Phosphatase, Worthington, U.S.A.) und 27 ml 0,1 m Magnesiumchlorid-Lösung wurde auf pH 9,5 eingestellt und auf 330 ml aufgefüllt. Nach zweitägigem Stehen bei 37° wurde die Lösung gefriergetrocknet. Es blieben 1,5 g eines lockeren, leicht gelblichen Pulvers zurück.

b. 2 g Dihydropyran-AMP-Verbindung wurden wie oben gelöst und auf pH 9,5 eingestellt. In Abständen von 1 - 2 Stunden wurde der pH-Wert wieder auf 9,5 gebracht und jeweils 50 mg Phosphatase nachgegeben. Nach 10 Stunden Stehen bei 37° wurde die Lösung gefriergetrocknet. Der Rückstand wog 3 g.

β . Trennung des Reaktionsgemisches

a. 1,5 g Gefriertrocknungsrückstand wurde dreimal mit je 40 ml Tetrahydrofuran extrahiert. Die Extrakte wurden vereinigt und am Rotationsverdampfer zur Trockne eingengt. Das zurückgebliebene zähe Öl wurde in Chloroform/Aceton/Pyridin 48/48/4 aufgenommen und an einer Kieselgelsäule (90 x 1,8 cm) mit dem gleichen System chromatographiert. Aus den ersten Fraktionen wurden 270 mg eines schwach gelblichen Öles erhalten. In der Dünnschichtchromatographie (System Chloroform/Pyridin 96/4) zeigte das Öl zwei Flecke, die ungefähr gleich stark waren.

In einem weiteren Versuch wurde die Chromatographie an Kieselgel mit dem System Chloroform/Pyridin 96/4 durchgeführt.

Nach einer Rechromatographie mit dem gleichen Lösungsmittelgemisch wurden zwei Substanzen in Form zäher Öle erhalten in Ausbeuten von je 0,1 g. Die schneller laufende Substanz wurde I genannt, die langsamere II.

b. 4,3 g des Gefriertrocknungsrückstandes wurden in einer schwach alkalischen (pH 9,5) Lösung von 3,0 g Äthylendiamintetraessigsäure in verdünnter Natronlauge aufgeschlämmt. Nach 1/2stündigem Rühren hatte sich der größte Teil gelöst. Das Unlösliche wurde abzentrifugiert und der klare Überstand fünfmal mit je 100 ml peroxydfreiem Diisopropyläther ausgeschüttelt. Die Diisopropylätherlösungen wurden vereinigt, einmal mit 100 ml 0,05 m Perjodatlösung (pH7,0) ausgeschüttelt, über Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum eingeeengt. Der Rückstand wurde an Kieselgel mit dem System Chloroform/Pyridin 96/4, wie oben beschrieben, einmal chromatographiert. Die Ausbeuten entsprachen den bei a.

4. Charakterisierung der Dihydropyran-AMP-Verbindungen.

a. Je etwa 20 mg Substanz I und II wurden in Methanol/Wasser 50/50 gelöst und aliquote Teile mit etwa 200 μ Mol der Hochspannungselektrophorese in Boratpuffer unterworfen (vgl. S. 51). Weder I noch II zeigte eine Wanderung. Auch die Reaktion mit Perjodat (S. 59) war negativ.

b. Je 20 mg Substanz I und II wurden in 2 n Essigsäure gelöst. Die Essigsäure wurde nach 2 Stunden durch Gefriertrocknung entfernt, der Rückstand in Wasser aufgenommen und der Hochspannungselektrophorese in Boratpuffer unterworfen. Es trat bei beiden Substanzen nur ein Fleck auf, der die gleiche Wanderungsgeschwindigkeit wie Adenosin zeigte.

D. Veresterungsversuche

a. In zwei Versuchen wurden je 300 mg Substanz I und II mit 400 mg DCC und 130 mg Carbobenzoxymal in 5 ml Pyridin zwei Tage stehen gelassen. Der entstandene Harnstoff wurde abfiltriert, das Pyridin im Rotationsverdampfer entfernt und aus dem Rückstand überschüssiges DCC mit Petroläther herausgewaschen. Der Rückstand wurde in Chloroform gelöst und eine kleine Menge davon der Dün-

schichtchromatographie unterworfen (System Chloroform/Pyridin 96/4). Es traten keine UV-absorbierenden Flecke auf, die nicht mit dem Ausgangsmaterial identisch waren.

b. In zwei weiteren Versuchen wurden je 250 mg Substanz I und II mit 180 mg Carbobenzoxypyridin und 350 mg N,N'-Carbonyl-diimidazol in etwa 20 ml Tetrahydrofuran 3 Stunden unter Rückfluß erwärmt. Je 0,05 ml des Reaktionsgemisches wurden dünn-schichtchromatographisch untersucht. Dabei trat in dem Reaktionsgemisch mit Substanz II ein neuer, schnell laufender und UV-absorbierender Fleck neben viel Ausgangsmaterial auf. Das Reaktionsgemisch wurde daraufhin zur Trockne eingedunstet, der Rückstand in Chloroform gelöst und der Chromatographie an einer Kieselgelsäule (90 x 1,8 cm) im System Chloroform/Pyridin 96/4 unterworfen. Aus den ersten Fraktionen wurde eine geringe Menge einer öligen Substanz erhalten, die mit 50 mg PdO-BaSO₄-Katalysator nach Kuhn (46) in 3 ml Eisessig hydriert wurde. Nach 40 Minuten wurde der Eisessig durch Gefriertrocknung entfernt und der Rückstand mit 0,01 n Essigsäure extrahiert. Im Extrakt wurden mittels Hochspannungselektrophorese in Citratpuffer zwei UV-absorbierende Substanzen nachgewiesen, die positiv mit Ninhydrin und negativ mit Perjodat reagierten (vgl. S. 59-60). Die Wanderungsgeschwindigkeit der einen Substanz entsprach der des Adenosins, die andere lief schneller als Adenosin, aber langsamer als Adenin.

c. Je 70 mg Substanz II wurden mit 50 mg Carbobenzoxypyridin und 300 mg N,N'-Carbonyl-diimidazol, wie unter b. beschrieben, in folgenden Lösungsmitteln umgesetzt: in Tetrahydrofuran mit Phenyllithium als Katalysator, in Tetrahydrofuran mit Tri-n-butylamin, in Tri-n-butylamin, in Pyridin und in Pyridin unter Zusatz von Tri-n-butylamin. Kleine Proben der Reaktionsgemische wurden mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie untersucht. Die Ausbeuten an der schneller laufenden Substanz waren nicht höher als bei b.

d. 50 mg Carbobenzoxypyridin wurden in 10 ml Acetonitril unter Zusatz von 20 mg Triäthylamin gelöst, zu einer Suspension von 50 mg N-Äthyl-5-phenylisoxazolium-3-sulfonat (49) gegeben und

gerührt, bis alles gelöst war. Nach Zugabe von 100 mg Substanz II wurde noch 12 Stunden gerührt. Dünnschichtchromatographisch ließ sich im Reaktionsansatz nur Ausgangsmaterial nachweisen.

Zusammenfassung der Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei chemische Probleme bearbeitet, die die Reaktionsfähigkeit und die Struktur der Aminoacyl-ribonucleinsäure betreffen, einer Überträgersubstanz in der biologischen Proteinsynthese.

Im ersten Teil wurden mit Hilfe von Modellsubstanzen Strukturelemente untersucht und bestimmt, die die hohe Reaktionsfähigkeit des Aminosäure-Ribonucleinsäure-Esters bedingen. Als Modelle wurden die Essigsäure-, Glycin- und Valinester des Cyclopentanol, des cis- und trans-Cyclopentandiols(1,2) und des cis- und trans-3,4-Dihydroxy-tetrahydrofurans in sterisch reiner Form hergestellt.

Aus dem Vergleich der Geschwindigkeiten, mit denen die Ester mit Natronlauge bzw. mit Hydroxylamin reagierten, wurden folgende Schlüsse gezogen: 1. Die zur Estergruppe benachbarte Hydroxylgruppe - und besonders die cis-ständige - erhöht die Reaktionsfähigkeit. 2. Der im Furanring der Ribose enthaltene Sauerstoff steigert die Reaktionsfähigkeit beträchtlich und verdeckt die durch einen Fünfring hervorgerufene sterische Hinderung der Reaktion. 3. Die Säurekomponente übt einen Einfluß auf die Reaktionsfähigkeit aus, der in Übereinstimmung mit der Erfahrung steht.

Die hohe Reaktionsfähigkeit der Ester wurde auf die induktiven Effekte der Sauerstoffatome zurückgeführt; eine Beteiligung von Wasserstoffbrücken und sterischen Faktoren wurde wahrscheinlich gemacht bzw. diskutiert. - Die hohe Reaktionsfähigkeit der Aminoacyl-ribonucleinsäure wird von den Estern des cis-3,4-Dihydroxy-tetrahydrofurans fast erreicht.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde über Versuche berichtet, mit denen bei der Synthese der Modellsubstanzen ausgearbeiteten Methoden die isomeren Aminosäureester des Adenosins herzustellen. Die

Synthese der 2'- und 3'-Aminosäure-Adenosin-Ester, die für die Strukturzuordnung wichtig sind, wurde auf folgendem Weg versucht: Im Adenosinmonophosphat wurden die freien Hydroxylgruppen mit Dihydropyran geschützt, anschließend wurde der Phosphatrest enzymatisch abgespalten. Die Adenosin-Dihydropyran-Verbindung wurde mit Carbobenzoxypyvalin umgesetzt und der entstandene Ester durch Hydrierung in Eisessig von den Schutzgruppen befreit. Die Stellung der Aminosäure im synthetischen Aminoacyl-adenosin ließ sich jedoch nicht mit Sicherheit zuordnen, weil im Verlauf des Syntheseweges eine geringe Isomerisierung stattgefunden hatte. - Das 5'-Valyladenosin konnte als einheitliches Isomeres erhalten werden, und zwar durch Kondensation von Carbobenzoxypyvalin mit 2',3'-Isopropyliden-adenosin und anschließende Entfernung der Schutzgruppen.

Literaturverzeichnis

- (1) Zusammenfassende Darstellungen: R.B.Loftfield, Progr. in Biophys. 8, 347 (1957); J.L.Simkin, Annu.Rev.Biochem. 28, 145 (1959); 10. Colloquium der Deutschen Gesellschaft für Physiol.Chem., Mosbach, April 1959
- (2) M.B.Hoagland in Nucleic Acids Vol. III, Academic Press, New York, 1960, S. 349
- (3) S.Brenner, F.Jacob, M.Meselson, Nature (London) 190, 596 (1961); F.Gros, H.Hiatt, W.Gilbert, C.G.Kurland, R.W.Risebrough, J.D.Watson, Nature (London), 190, 581 (1961)
- (4) M.B.Hoagland, 12. Brookhaven Symposium, Upton N.Y. (1959) S. 40
- (5) E.S.Canellakis, Biochim.Biophys.Acta (Amsterdam) 25, 217 (1957)
- (6) L.I.Hecht, M.L.Stephenson, P.C.Zamecnik, Fed.Proc. 17, 239 (1958); dieselben, Proc.Nat.Acad.Sci. U.S.A. 45, 505 (1959)
- (7) H.G.Zachau, G.Acs, F.Lipmann, Proc.Nat.Acad.Sci. U.S.A. 44, 885 (1958)
- (8) M.B.Hoagland, E.B.Keller, P.C.Zamecnik, J.biol.Chemistry 218, 345 (1956)
- (9) J.Mager, F.Lipmann, Proc.Nat.Acad.Sci. U.S.A. 44, 305 (1958)
- (10) J.Leahy, E.Glassman, R.S.Schweet, J.biol.Chemistry 235, 3209 (1960)
- (11) E.Glassman, E.H.Allen, R.S.Schweet, J.Amer.chem.Soc. 80, 4427 (1958)

- (12) F.Lipmann, W.C.Hülsmann, G.Hartmann, H.G.Boman, G.Acs, J.cellular comparat. Physiol. 54, Suppl. I, 75 (1959)
- (13) J.Preiss, P.Berg, E.J.Ofengand, F.H.Bergmann, M.Dieckmann, Proc.Nat.Acad.Sci. U.S.A. 45, 319 (1959)
- (14) C.Kitzinger, T.Benzinger, Z.Naturf. 10b, 375 (1955)
- (15) P.Berg, E.J.Ofengand, Proc.Nat.Acad.Sci. U.S.A. 44, 78 (1958)
- (16) H.G.Zachau, Chem.Ber. 93, 1822 (1960)
- (17) Teile dieser Arbeit sind veröffentlicht worden:
H.G.Zachau, W.Karau, Chem.Ber. 93, 1830 (1960)
- (18) N.A.Milas, S.Sussman, J.Amer.chem.Soc. 59, 2345 (1937)
- (19) Org.Syntheses 28, 35 (1948)
- (20) R.B.Woodward, F.V.Brutcher Jr., J.Amer.chem.Soc. 80, 209 (1958); F.V.Brutcher Jr., G.Evans, J.org.Chemistry 23, 618 (1958)
- (21) van Loon, Dissertation Delft 1919, S. 46
- (22) L.N.Owen, P.N.Smith, J.chem.Soc. 1952, 4026
- (23) P.E.Verkaide, J.Coops,Jr., C.J.Maan, A.Verkaide-Sandbergen, Liebigs Ann.Chem. 467, 217 (1928)
- (24) W.Reppe und Mitarbeiter, Liebigs Ann.Chem. 596, 138 (1955)
- (25) H.Klostermann, F.Smith, J.Amer.chem.Soc. 74, 5336 (1952)
- (26) D.P. 825 684 (1950) Farbenfabriken Bayer, E.Schmidt, R. Schnegg

- (27) H.G.Khorana, A.R.Todd, J.chem.Soc. 1953, 2257
- (28) J.C.Sheehan, G.P.Hess, J.Amer.chem.Soc. 77, 1067 (1955)
- (29) G.Schulz, K.Fiedler, Chem.Ber. 89, 2681 (1956)
- (30) M.Bergmann, L.Zervas, Hoppe-Seyler's Z.physiol.Chem. 175, 145 (1928); T.Wieland, G.Schneider, Liebigs Ann.Chem. 580, 159 (1953)
- (31) H.A.Staab, Liebigs Ann.Chem. 609, 75, 83 (1957)
- (32) G.W.Anderson, R.Paul, J.Amer.chem.Soc. 80, 4423 (1958)
- (33) H.A.Staab, Angew.Chem. 71, 194 (1959)
- (34) E.Stahl, Chemiker-Ztg. 82, 323 (1958)
- (35) H.N.Rydon, P.W.G.Smith, Nature (London) 169, 922 (1952)
- (36) A.Stoll, F.Roxler, J.Peyer, A.Hofmann, Helv.chim.Acta 38, 1469 (1955)
- (37) L.Jaenicke, Naturwiss. 39, 87 (1952)
- (38) H.T.Gordon, W.Thornburg, L.N.Werum, Analytic.Chem. 28, 849 (1956)
- (39) F.Lipmann, L.C.Tuttle, J.biol.Chemistry 159, 21 (1945)
- (40) W.P.Jencks, J.Amer.chem.Soc. 80, 4581, 4585 (1958)
- (41) E.A.Guggenheim, Phil.Mag.(7) 2, 538 (1926), zitiert nach R.Huisgen, Houben Weyl III/1, Thieme-Verlag Stuttgart, 1955, S. 101
- (42) Messung von A.Skrabal und Mitarbeitern, zitiert nach J.Hine, Reaktivität und Mechanismus in der organischen Chemie, Thieme-Verlag Stuttgart, 1960, S. 266

- (43) P.A.Levine, R.E.Steiger, A.Rothen, J.biol.Chemistry 97, 717 (1932)
- (44) D.M.Brown, A.R.Todd in Nucleic Acids Vol. I, Academic Press New York, 1955, S. 409
- (45) T.Wieland, H.Merz, G.Pfleiderer, Chem.Ber. 93, 1816 (1960)
- (46) R.Kuhn, H.J.Haas, Angew.Chem. 67, 785 (1955)
- (47) R.Markham, J.D.Smith, Biochem.J. 49, 401 (1951)
- (48) H.A.Staab, W.Rohr, A.Mannschreck, Angew.Chem. 73, 143 (1961)
- (49) R.B.Woodward, R.A.Olofson, H.Mayer, J.Amer.chem.Soc. 83, 1010 (1961)
- (50) S.W.Fox, M.Fling, H.Wax, C.W.Pettinga, J.Amer.chem.Soc. 72, 1862 (1950)
- (51) M.Godchot, F.Taboury, C.R.hebd.Séances Acad.Sci. 152, 881 (1911)
- (52) S.Olsen, Acta chem.scand. 4, 462 (1950) und frühere Literatur
- (53) T.P.Salo, Arch.Biochem. and Biophys. 42, 106 (1953)
- (54) A.M.Michelson in Annual Review of Biochemistry 30, 144 (1961)

Lebenslauf

Am 18. Mai 1934 wurde ich als Sohn des Studienrates Friedrich Karau und seiner Ehefrau Else, geb. Felber, in Schneidemühl geboren.

Von 1940 bis 1944 besuchte ich die Volksschule in Deutsch Krone. Infolge der Kriegssereignisse begann ich erst 1946 mit dem Besuch der Oberschule in Eutin. 1947 kam ich auf die Oberschule in Nordhorn, wo ich 1954 die Reifeprüfung ablegte.

Im Sommersemester 1954 begann ich an der Universität Münster mit dem Studium der Chemie und bestand dort im Februar 1957 die Diplom-Vorprüfung. Im Sommersemester 1957 setzte ich das Studium an der Ludwig-Maximilians-Universität in München fort und legte im Dezember 1958 die mündliche Diplomchemiker-Hauptprüfung ab.

Vom Januar 1959 bis Juni 1961 führte ich am Max-Planck-Institut für Biochemie in München meine Diplom- und Doktorarbeit durch.

